

**Univerzita Karlova v Praze  
Lékařská fakulta v Hradci Králové**

**Role Nrf2 u vybraných modelů poškození jater**

**DISERTAČNÍ PRÁCE**

**Vojtěch Mezera**

**2015**

**Univerzita Karlova v Praze  
Lékařská fakulta v Hradci Králové**

**Doktorský studijní program  
Fyziologie a patologická fyziologie**

**Název práce (v ČJ )  
Role Nrf2 u vybraných modelů poškození jater**

**Název práce (v AJ)  
The role of Nrf2 in selected models of liver injury**

**Autor: MUDr. Vojtěch Mezera**

**Školitel: Prof. MUDr. Zuzana Červinková, CSc.**

**Hradec Králové, 31. 3. 2015**

.....

**Obhajoba dne:**

(doplň studijní odd.)

## **Příloha č. 2**

### **Prohlášení autora**

---

#### **Prohlášení:**

Prohlašuji tímto, že jsem doktorskou disertační práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje. Zároveň dávám souhlas k tomu, aby tato práce byla uložena v Lékařské knihovně Lékařské fakulty UK v Hradci Králové a zde užívána ke studijním účelům za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou publikační nebo přednáškovou činnost, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v informačním systému Univerzity Karlovy v Praze.

**Hradec Králové, 31. 3. 2015**

---

.

## Poděkování

Hned na úvod bych chtěl poděkovat především své školitelce, Prof. MUDr. Zuzaně Červinkové, CSc., za vedení celým postgraduálním studiem. Bylo toho mnoho, počínaje sestavením studijního plánu, kontrolu žádosti o grant, protokolů k experimentům, publikací... a (ne)konče provedením četných parciálních hepatektomií u potkanů, které paní profesorka dělá cca 60x rychleji (!), než trvá resekce jater u člověka.

Další dík patří mému kolegovi a kamarádovi Ottovi Kučerovi. Ač sám již docentem, byl ochoten mi kdykoliv poradit, vysvětlit i cokoliv prakticky ukázat. Právě Otto mě uvedl do tajů mnoha laboratorních postupů. Obrovský dík mu náleží za pomoc při zavádění modelu izolace myších hepatocytů. Nebýt Oty, nikdy bych zřejmě pokusy na geneticky modifikovaných myších neudělal.

Další, které nemohu opomenout, jsou pracovníci Ústavu fyziologie, kteří mi pomáhali při různých měřeních: Alena Moravcová, Jana Ondráková, Monika Pospíšilová, Tomáš Roušar, David Rychtřmoc, Ondřej Sobotka, Marie Vaculová.

Ku mému velkému štěstí nepanuje na naší fakultě řevnivost, nýbrž nápomocnost ústavů mezi sebou. Proto zde mohu vyslovit velký dík rovněž dalším lidem z Lékařské fakulty v Hradci Králové, kteří mi přispěli radou, měřením či jinými svými cennými znalostmi a schopnostmi: René Endlicher, Dagmar Ježková, Hana Laštůvková, Rajiv Mandalia, Yvona Mazurová, Stanislav Mičuda, Mohamed Niang, Eva Peterová, Miroslav Podhola, Matthew Shane Renfro, Tomáš Roušar, David Rychtřmoc, Helena Živná.

Zatímco předchozí jména jsou konkrétní, má poslední poděkování jsou zcela imaginární, neboť dotyční je nikdy neuslyší: Děkuji oněm neznámým editorům, oponentům a recenzentům, kteří se zabývali naší žádostí o grant a články.

Tato práce vznikla za podpory grantů GA UK 668512, PRVOUK P37/02, SVV-2013-266901 a SVV-2014-260058.

# Obsah

<b>SEZNAM ZKRATEK .....</b>	<b>9</b>
<b>1. ÚVOD DO PROBLEMATIKY .....</b>	<b>11</b>
1.1 OXIDAČNÍ STRES .....	11
1.1.1. <i>Oxidační stres při toxickém poškození jater.....</i>	<i>11</i>
1.1.2. <i>Oxidační stres u ischemicko-reperfúzního poškození.....</i>	<i>13</i>
1.1.3. <i>Regenerace jater po parciální hepatektomii.....</i>	<i>14</i>
1.1.4. <i>Oxidační stres u nealkoholového ztukovatění jater (NAFLD).....</i>	<i>17</i>
1.2 ANTIOXIDANTY .....	17
1.2.1. <i>Přímo působící antioxidanty .....</i>	<i>18</i>
1.2.2. <i>Nrf2 a nepřímo působící antioxidanty .....</i>	<i>19</i>
1.2.3. <i>Epigalokatechingalát.....</i>	<i>20</i>
1.2.3.1. <i>Terapeutické a toxické dávky epigalokatechingalátu.....</i>	<i>21</i>
1.3 VLIV GENOTYPU NA JÁTRA .....	22
1.3.1. <i>Role Nrf2.....</i>	<i>22</i>
1.3.2. <i>Apolipoprotein E .....</i>	<i>23</i>
<b>2. CÍLE PRÁCE .....</b>	<b>24</b>
2.1 ČÁST PRVNÍ: VLIV EPIGALOKATECHINGALÁTU NA JÁTRA.....	24
2.2 ČÁST DRUHÁ: VLIV GENOTYPU APOLIPOPROTEINU E NA HEPATOTOXICITU .....	24
<b>3. MATERIÁLY A METODY .....</b>	<b>25</b>
3.1 ČÁST PRVNÍ: VLIV EPIGALOKATECHINGALÁTU NA JÁTRA.....	25
3.1.1 <i>Použité chemikálie a reagentia.....</i>	<i>25</i>
3.1.2 <i>Pokusná zvířata pro in vivo experiment .....</i>	<i>25</i>
3.1.3 <i>Protokol experimentu in vivo .....</i>	<i>26</i>
3.1.3.1. <i>Parciální hepatektomie.....</i>	<i>27</i>
3.1.3.2. <i>Usmrcení potkanů a odběr materiálu .....</i>	<i>28</i>
3.1.4 <i>Biochemie séra .....</i>	<i>28</i>
3.1.5 <i>Měření tkáňového glutathionu .....</i>	<i>29</i>
3.1.6 <i>Měření tkáňového malondialdehydu .....</i>	<i>29</i>
3.1.7 <i>Měření tkáňových cytokinů.....</i>	<i>29</i>
3.1.8 <i>Aktivita kaspáz 3/7 v homogenátu .....</i>	<i>30</i>
3.1.9 <i>Expres proteinů p21, p-p27, p-p53, Bcl-2 .....</i>	<i>30</i>
3.1.10 <i>Expres RNA genů HO-1 a Nqo-1 .....</i>	<i>31</i>
3.1.11 <i>Histopatologická analýza.....</i>	<i>31</i>
3.1.12 <i>Pokusná zvířata pro in vitro experimenty .....</i>	<i>31</i>
3.1.13 <i>Protokol experimentu in vitro .....</i>	<i>32</i>
3.1.14 <i>Izolace potkaních hepatocytů.....</i>	<i>32</i>
3.1.15 <i>Morfologické zhodnocení.....</i>	<i>35</i>
3.1.16 <i>Testy viability: WST-1 test, aktivita LDH, syntéza albuminu.....</i>	<i>36</i>
3.1.17 <i>Markery oxidačního stresu: malondialdehyd a DCFDA.....</i>	<i>36</i>
3.1.18 <i>Aktivita kaspáz 3 a 7.....</i>	<i>37</i>
3.1.19 <i>Syntéza DNA .....</i>	<i>37</i>
3.1.20 <i>Expres proteinů p-p53, Bcl-2 a DR5.....</i>	<i>37</i>
3.1 ČÁST DRUHÁ: VLIV GENOTYPU APOLIPOPROTEINU E NA HEPATOTOXICITU .....	38

3.2.1	<i>Použité chemikálie a reagentia</i> .....	38
3.2.2	<i>Zvířata</i> .....	38
3.2.3	<i>Izolace myších hepatocytů</i> .....	39
3.2.4	<i>Mikroskopické zhodnocení</i> .....	39
3.2.5	<i>Testy viability: WST-1, aktivita LDH</i> .....	41
3.2.6	<i>Markery oxidačního stresu: DCFDA a MDA</i> .....	41
3.2.7	<i>Metabolismus glutathionu</i> .....	41
3.2.8	<i>Aktivita kaspáz 3 a 7</i> .....	41
3.2.9	<i>Izolace proteinů a Western blot</i> .....	42
3.2.10	<i>Izolace RNA a kvantitativní real-time PCR</i> .....	42
3.2.11	<i>Statistické zhodnocení</i> .....	43
<b>4.</b>	<b>VÝSLEDKY</b> .....	<b>44</b>
4.1	ČÁST PRVNÍ: VLIV EPIGALOKATECHINGALÁTU NA JÁTRA.....	44
4.1.1	<i>Hmotnosti potkanů a jater</i> .....	44
4.1.2	<i>Histologické nálezy</i> .....	46
4.1.3	<i>Biochemie séra</i> .....	48
4.1.4	<i>Tkáňové cytokiny a markery oxidačního stresu</i> .....	49
4.1.5	<i>Aktivita kaspáz in vivo</i> .....	50
4.1.6	<i>Expres bílkovin regulujících buněčný cyklus</i> .....	50
4.1.7	<i>Genová exprese Hmox1 a Nqo1 in vivo</i> .....	51
4.1.8	<i>Buněčná viabilita a funkční parametry hepatocytů in vitro</i> .....	51
4.1.9	<i>Markery oxidačního stresu in vitro</i> .....	51
4.1.10	<i>Syntéza DNA in vitro</i> .....	52
4.1.11	<i>Morfologie buněk in vitro</i> .....	54
4.1.12	<i>Aktivita kaspáz in vitro</i> .....	55
4.1.13	<i>Expres proteinů in vitro</i> .....	55
4.2	ČÁST DRUHÁ: VLIV GENOTYPU APOLIPOPROTEINU E NA HEPATOTOXICITU .....	56
4.2.1	<i>Buněčná viabilita</i> .....	56
4.2.2	<i>Mikroskopické hodnocení</i> .....	57
4.2.3	<i>Mitochondriální membránový potenciál (MMP)</i> .....	58
4.2.4	<i>Markery oxidačního stresu</i> .....	60
4.2.5	<i>Metabolismus glutathionu</i> .....	60
4.2.6	<i>Aktivita kaspáz</i> .....	60
4.2.7	<i>Expres proteinů</i> .....	62
4.2.8	<i>Genová exprese</i> .....	63
<b>5.</b>	<b>DISKUZE</b> .....	<b>65</b>
5.1	ČÁST PRVNÍ: VLIV EPIGALOKATECHINGALÁTU NA JÁTRA.....	65
5.2	ČÁST DRUHÁ: VLIV GENOTYPU APOLIPOPROTEINU E NA HEPATOTOXICITU .....	71
<b>6.</b>	<b>ZÁVĚRY</b> .....	<b>73</b>
6.1	ČÁST PRVNÍ: VLIV EPIGALOKATECHINGALÁTU NA JÁTRA.....	73
6.2	ČÁST DRUHÁ: VLIV GENOTYPU APOLIPOPROTEINU E NA HEPATOTOXICITU .....	73
<b>7.</b>	<b>POUŽITÁ LITERATURA</b> .....	<b>74</b>
	<b>PŘÍLOHY – PRVOAUTORSKÉ ČLÁNKY AUTORA V ČASOPISECH S IF</b> .....	<b>85</b>

## Seznam zkratek

AI	aqua pro injectione (voda pro injekce)
ALT	alaninaminotransferáza
ALP	alkalická fosfatáza
APAP	acetaminofen (paracetamol)
APAP-SG	konjugát acetaminofenu s glutathionem
ApoE	apolipoprotein E
ApoE3	apolipoprotein E3
ApoE4	apolipoprotein E4
ARE	antioxidant response element
AST	aspartátaminotransferáza
B2m	Beta 2-mikroglobulin
Bl	blank (samotné medium bez buněk)
BrdU	bromdeoxyuridin
CYP2E1	isoforma 2E1 cytochromu P450
DCFDA	dichlorodihydrofluoresceindiacetát
EGCG	epigalokatechingalát
EGCG20	epigalokatechingalát v dávce 20 mg/kg tělesné hmotnosti
EGCG50	epigalokatechingalát v dávce 50 mg/kg tělesné hmotnosti
GSH	glutathion (redukována forma)
GSSG	glutathion (oxidovaná forma)
Gsta2	glutathion S-transferáza 2
HepEx	pracovní skupina experimentální hepatologie působící na Ústavu fyziologie, Lékařské fakultě Univerzity Karlovy v Hradci Králové
Hmox1	hemoxigenáza-1
HRR	hepatic regeneration rate (Selzner a Clavien, 2000)
IL-6	interleukin-6
Keap1	Kelch-like ECH-associated protein 1
LAP	laparotomie
LDH	laktátdehydrogenáza
LRR	liver regeneration rate (Murata et al., 2007)

MDA	malondialdehyd
MMP	mitochondriální membránový potenciál
NAFLD	non-alcoholic fatty liver disease (nealkoholové ztukovatění jater)
Nqo-1	NAD(P)H-chinon-oxidoreduktáza-1
Nrf2	nuclear factor erythroid 2-related factor 2
PHx	2/3 parciální hepatektomie
Polr2a	Polypeptid A RNA-Polymeráza II
RIPA	pufr využívaný k lýze buněk
ROS	reactive oxygen species (reaktivní formy kyslíku)
SOD	superoxiddismutáza
TGF- $\beta$ 1	transformující růstový faktor beta1
TNF- $\alpha$	tumor nekrotizující faktor alpha
WE	Williams E medium, bez přidaného séra
WP	well-plate (mikrotitrační destička)
WT	wild-type
WST-1	water-soluble tetrazolium salts, test aktivity buněčných dehydrogenáz



# **1. Úvod do problematiky**

## **1.1 Oxidační stres**

Oxidační stres je souhrn dějů, které se odehrávají v důsledku působení volných kyslíkových radikálů též označovaných jako reaktivní formy kyslíku (ROS). Obecně se pod tímto pojmem myslí působení nepříznivé, vedoucí k poškození makromolekul (bílkovin, lipidových membrán, DNA), a tím k poškození až smrti buněk (Hayes a McLellan, 1999, Maiese et al., 2010, Knight et al., 2001). Oxidačnímu stresu bývá rovněž přisuzován podíl na stárnutí a vzniku nádorů (Dinkova-Kostova a Talalay, 2008, Holtzclaw et al., 2004, Wallace, 2005, Melov et al., 2000). Samotné podávání antioxidantů však nevede k zásadnímu prodloužení života (Strong et al., 2013).

ROS zahrnují zejména superoxidový radikál, hydroxylový radikál a peroxid vodíku. Tyto reaktivní částice vznikají v buňkách kontinuálně jako důsledek přenosu elektronů v mitochondriích nebo činností xantinoxidázy, lipooxygenázy a cyklooxygenázy. Dále mohou ROS vznikat jako důsledek metabolické přeměny tělu cizích látek prostřednictvím cytochromu P450 či působením vlivů prostředí jako velkého množství solí železa či UV zářením (Hayes a McLellan, 1999, Wallace, 2005). Ačkoliv je tedy kyslík nezbytný pro efektivní tvorbu ATP díky transportním systémům dýchacího řetězce předávajícím molekulám  $O_2$  elektrony, je rovněž potenciálně toxický. Aerobní organismy byly a jsou schopny přežít jen díky tomu, že si vytvořily antioxidační systémy. Tendence k poškození makromolekul souvisí i s faktem, že molekula  $O_2$  je 5-8x rozpustnější v organických roztocích než ve vodě (Halliwell, 2001).

### **1.1.1. Oxidační stres při toxickém poškození jater**

Jak bylo uvedeno výše, mohou reaktivní formy kyslíku vznikat při biotransformaci cizorodých látek (Hayes a McLellan, 1999). Toxické poškození jater má celou řadu patogenetických mechanismů, přičemž oxidační stres hraje významnou roli v toxicitě mnoha látek (Jaeschke et al., 2002). Oxidační stres je zde považován za příčinu i následek poškození.

Produkty lipoperoxidace, jako je např. 4-hydroxynonenal, mají chemotaktické účinky na neutrofilní granulocyty (Curzio et al., 1986) a mohou být zodpovědné za pokračování a rozšíření jaterního poškození (Liu et al., 1994, Jaeschke et al., 2002). Prostřednictvím aktivace transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B mohou ROS zvýšit produkci cytokinů a zesilovat zánětlivou reakci (Jaeschke, 2000).

ROS pocházející z neutrofilních granulocytů jsou zodpovědné za nitrobuněčný oxidační stres v hepatocytech po působení galaktosaminu a endotoxinu. Peroxidy pocházející z neutrofilů jsou zřejmě schopny difundovat do hepatocytů a podílet se na buněčné smrti *in vivo* (Jaeschke et al., 1999). Podobné platí pro oxidační stres způsobený makrofágy, v případě jater tedy Kupfferovými buňkami (Bilzer et al., 1999, Jaeschke et al., 2002, Michael et al., 1999). Léková toxicita aktivuje neutrofile i Kupfferovy buňky jak přímo, tak nepřímo přes aktivaci komplementu (Jaeschke et al., 2002).

Dalšími, zčásti navazujícími mechanismy toxického poškození jater je otevření tzv. póru přechodné permeability v mitochondriích (mitochondrial membrane permeability transition pore) a následné zhroucení mitochondriálního membránového potenciálu. Deficit ATP pak vede ke smrti buňky (Nieminen et al., 1995, Merrill et al., 2002).

Toxické poškození jater může být sledováno v modelech akutního poškození *in vitro* (Merrill et al., 2002, Stankova et al., 2010), akutního poškození *in vivo* (Kucera et al., 2011, Kucera et al., 2012b, Chilakapati et al., 2007), jakož i subakutního (Thangapandian a Miltonprabu, 2013) a chronického poškození *in vivo* (Ishikawa et al., 2011, Tipoe et al., 2010, Yasuda et al., 2009).

Příklady hepatotoxinů, kde se právě tvorba ROS na toxicitě podílí, jsou uvedeny v Tabulce 1.

Tabulka 1. Hepatotoxické látky navozující oxidační stres

Název látky	Reference
Acetaminofen (paracetamol)	(Jaeschke et al., 2003a, Jaeschke et al., 2003b)
Etanol	(Kaviarasan et al., 2008, Mansouri et al., 1999)
Galaktosamin	(Liu et al., 2013, Abe et al., 2005)
Tert butyl hydroperoxid	(Červinková et al., 2009, Endlicher et al., 2009)
Tetrachlormetan (CCl <sub>4</sub> )	(Tipoe et al., 2010, Bahcecioglu et al., 2008)
Thioacetamid	(Kucera et al., 2011, Pallottini et al., 2006)

Toxicita zprostředkovaná oxidačním stresem může být snížena prostřednictvím aktivace transkripčního faktoru Nrf2, jak bylo doloženo pracemi s jeho indukci na podkladě genetické modifikace (Mobasher et al., 2013, Ni et al., 2012b, Liu et al., 2013) či farmakologicky (Reisman et al., 2009a, Kwak a Kensler, 2010).

### **1.1.2. Oxidační stres u ischemicko-reperfúzního poškození**

Uzávěr cév, který se používá při jaterních resekcích k prevenci krvácení, způsobuje ischemicko-reperfúzní poškození. Reperfúze v játrech pak zvyšuje poškození buněk prostřednictvím oxidačního stresu a zánětlivé reakce (Bahde a Spiegel, 2010). Oxidační stres hraje roli v rozvoji ischemicko-reperfúzního poškození, a to jak v játrech (Jaeschke a Lemasters, 2003, Jaeschke a Farhood, 1991), tak u dalších orgánů, např. plic (al-Mehdi et al., 1994) či srdce (Kehrer a Paraidathathu, 1992).

Ischémie je definována jako přerušení dodávky kyslíku a substrátů spolu s nemožností odstraňovat metabolity. Ischémie vede k poklesu koncentrace nitrobuněčného ATP, selhání Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPázy, zvětšení objemu buněk a nahromadění nitrobuněčného vápníku. Reperfúze jater zesiluje buněčné poškození prostřednictvím oxidačního stresu a zánětlivé reakce. Počáteční fáze ischemicko-reperfúzního poškození (během 2 h po reperfúzi) zahrnuje uvolnění reaktivních forem kyslíku a prozánětlivých působků z Kupfferových buněk, zejména TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 a eikosanoidů. ROS mohou způsobit lipoperoxidaci, změnu mitochondriální permeability, apoptózu i nekrózu hepatocytů i endoteliálních buněk. Pozdější fáze (6 – 48 h po reperfúzi) se vyznačuje neutrofily zprostředkovanou zánětlivou odpovědí, která poškozuje hepatocyty zejména produkcí ROS a proteolytických enzymů. Rovněž zvýšená lokální agregace destiček může narušit mikrocirkulaci a zhoršit jaterní poškození (Bahde a Spiegel, 2010, Jaeschke a Lemasters, 2003).

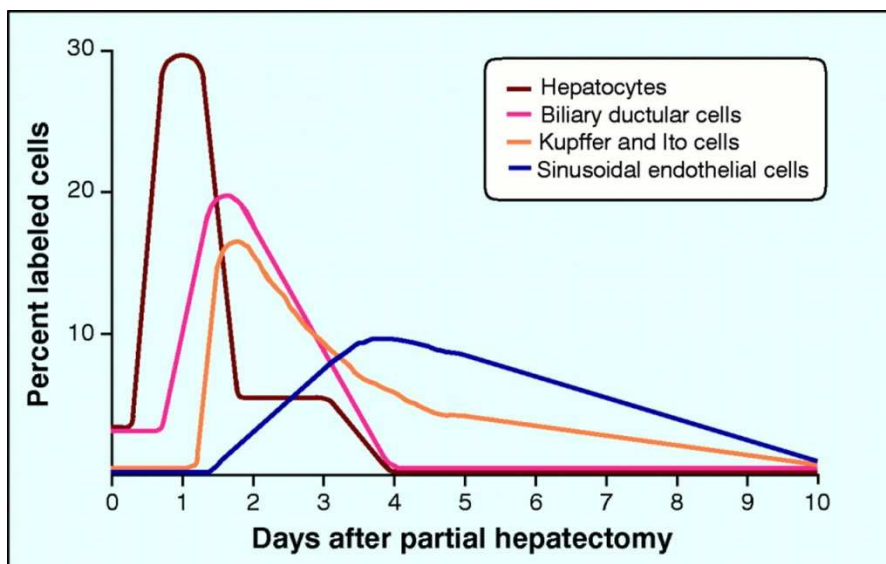
Některé chirurgické postupy pro předcházení tomuto poškození již našly svou cestu do klinické praxe, zatímco případné farmakologické přístupy zůstávají omezeny (Bahde a Spiegel, 2010, Gurusamy et al., 2010). Podle nedávných metaanalýz byly přínosy farmakologického “preconditioningu” pouze dílčí a nebyly prokázány rozdíly co do mortality, výskytu jaterního selhání a perioperační morbidit (Abu-Amara et al., 2010, Abu-Amara et al., 2009).

### 1.1.3. Regenerace jater po parciální hepatektomii

Játra mají unikátní schopnost regenerovat po odstranění jejich části. Pozoruhodná je skutečnost, že hepatocyty, které představují asi 65% buněk v játrech savců, mají za normálních podmínek nízkou proliferační aktivitu a dlouhou životnost. Po parciální hepatektomii jsou však schopny proliferovat a vykonat jedno nebo více synchronizovaných buněčných dělení, než se vrátí do klidového stavu, za současného zachování své funkce. Stejnými principy se řídí i transplantovaná játra, neboť malý transplantát je schopen dorůst na potřebnou velikost. Naopak příliš velký transplantát je schopen se zmenšit (Yamada et al., 1997, Michalopoulos, 2007).

Velkou výhodou parciální hepatektomie jako modelu pro studium regenerační odpovědi je to, že po chirurgickém odstranění příslušných jaterních laloků zůstává zbylá jaterní tkáň nepoškozená. Na rozdíl od modelů toxických poškození jater není v případě regenerace po PHx přítomno poškození tkáně a zánětlivá reakce, navíc je začátek regenerace přesně definován časem odstranění laloků. Ve zbylých lalocích dochází procesem kompenzatorní hypertrofie a především hyperplazie k náhradě odstraněné jaterní tkáně, přičemž ovšem nedochází k rekonstrukci odstraněných laloků. Na rozdíl od jiných orgánů schopných regenerace, jako je kůže a kostní dřeň, nejsou játra závislá na kmenových nebo progenitorových buňkách. Místo toho dochází k proliferaci všech diferencovaných buněk: v první řadě hepatocytů, ale také epitelii žlučových kanálků, sinusoidálních endotelií, Kupfferových buněk a Itových buněk (též nazývaných hvězdicové buňky). Pokud by došlo k selhání proliferační schopnosti hepatocytů nebo epitelii žlučových kanálků, jsou tyto buněčné typy schopné být jeden druhému jakýmsi fakultativními kmenovými buňkami (Michalopoulos, 2014). Při zablokování proliferace hepatocytů se objevují tzv. oválné buňky, které mají některé znaky hepatocytů, buněk žlučových kanálků, ale i kmenových buněk. Jejich původ není zcela jasný, ale pravděpodobně pocházejí z buněk žlučových kanálků (Kang et al., 2012b).

Hepatocyty jsou první buňky, které začnou po PHx proliferovat. Proliferace hepatocytů začíná v periportálních polích a posléze pokračuje do polí pericentrálních. Hepatocyty rovněž produkují růstové faktory, které slouží jako mitogeny pro ostatní buněčné typy. Jedním z prvních kroků zahajujících regeneraci jater po PHx je zřejmě upregulace urokinázového aktivátoru plasminogenu v membránách hepatocytů, který pak z mezibuněčné matrix uvolní hepatocytární růstový faktor (HGF). Ten pak vede ke změně v expresi řady genů, jak je typické pro stav po PHx (Michalopoulos a DeFrances, 1997).



Obrázek 1 – kinetika syntézy DNA u jednotlivých typů buněk během regenerace jater. Převzato z (Michalopoulos a DeFrances, 1997).

Mezi faktory spouštějící tyto děje patří mj. hemodynamické změny bezprostředně po PHx. Zvýšený přítok portální krve do jater rovněž poskytne hepatocytům vyšší nabídku epidermálního růstového faktoru EGF, který je produkován v Brunnerových žlázách duodena. Receptor pro EGF je aktivován v podobném čase jako c-Met, což je receptor pro HGF. Jiným možným vysvětlením je vzájemná aktivace c-Met a receptoru pro EGF (Michalopoulos, 2007).

Hepatocyty v intaktních játrech jsou schopny reagovat na řadu růstových faktorů až po ovlivnění určitými stimuly, mezi něž se řadí cytokiny TNF- $\alpha$  a IL-6. Během této iniciální fáze, která přibližně odpovídá prvním 4 hodinám po PHx, dochází k aktivaci transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B a posléze i faktorů AP-1 a STAT3. Aktivace NF- $\kappa$ B se odehrává v řádu minut po PHx a je pouze přechodná. Aktivace faktorů AP-1 a STAT3 je pomalejší, v případě STAT3 přetrvává po 6 hodin i více. TNF- $\alpha$  je nezbytný právě pro aktivaci faktoru NF- $\kappa$ B. Zablokování TNF- $\alpha$  specifickými protilátkami (Akerman et al., 1992) nebo geneticky podmíněné chybění TNFR-I (tj. receptoru pro TNF- $\alpha$ ) vedlo ke zpoždění syntézy DNA a regenerační odpovědi celkově. Role IL-6 následující po TNF- $\alpha$  byla dokumentována obnovením regenerační schopnosti jater s chybějícím receptorem pro TNF- $\alpha$  po podání IL-6. Signální sekvence je tedy zřejmě následující:

TNF- $\alpha$   $\rightarrow$  TNFR-I  $\rightarrow$  NF- $\kappa$ B  $\rightarrow$  IL-6  $\rightarrow$  STAT3 ... cyklin D1 ... syntéza DNA  
(Yamada et al., 1997).

TNF- $\alpha$  je rovněž schopen indukovat expresi matrix metaloproteáz a tím přispět k remodelaci extracelulární matrix. Roli v regeneraci jater po PHx hrají dále inzulin, noradrenalin, serotonin (Michalopoulos, 2007) a trijodtyronin (Cervinkova et al., 1984). Další z cytokinů, TGF- $\beta$ 1, má zřejmě inhibiční účinek na regeneraci a udržuje hepatocyty v klidové fázi (Kang et al., 2012b, Michalopoulos, 2007).

Během regenerace jater po parciální hepatektomii dochází ke změnám exprese řady pro- a anti-apoptotických genů. Některé z nich, například anti-apoptotický Bcl-x vykazují cyklické změny exprese. V intervalu 24 hodin od PHx se objevuje maximum exprese pro-apoptotického genu Bad a naopak nízká exprese anti-apoptotického genu Bcl-x (Tzung et al., 1997).

U mladých potkanů a myší proliferuje po PHx 95% hepatocytů a původní hmotnost jater je obnovena za 7 až 10 dnů (Yamada et al., 1997). V některých pracích je popsána doba regenerace jater u potkanů 14 dnů s tím, že ani tehdy ještě není obnovena hmotnost jater na původní. Následující signální dráhy vykazují změnu genové exprese v závěrečné fázi regenerace jater a hrají zřejmě roli v ukončení jaterní regenerace po PHx: PPAR, glycerofosfolipidový metabolismus, komplement, koagulační kaskáda, signální dráha proteinu p53 a ribosomy (Rychtrmóc et al., 2012). Následná přestavba jaterních lobulů a návrat k normální architektonice může trvat i několik týdnů (Michalopoulos, 2007).

Regenerace jater sama o sobě byla shledána jako stav zvýšené tvorby ROS (Han et al., 2006, Frances et al., 2007, Ronco et al., 2002). Nadměrné zvýšení oxidačního stresu, které nastalo u myší s knockoutem genu pro transkripční faktor Nrf2, vedlo k významnému zpomalení jaterní regenerace. Mechanismem tohoto zpomalení je resistance na inzulin a inzulinu podobný růstový faktor IGF-1. Spolu s tím byla narušena i aktivace p38 kinázy ze skupiny mitogeny-aktivovaných kináz a Akt kinázy (Beyer et al., 2008). Nedávná studie však ukázala, že ani nadbytek Nrf2 není prospěšný: myši s konstitutivní aktivací Nrf2 při defektu vazby na inhibitor Keap1 vykazovaly vyšší náchylnost k apoptóze a opoždění proliferace (Kohler et al., 2014).

Vliv antioxidantů na regeneraci jater po parciální hepatektomii zůstává kontroverzní: někteří autoři popsali urychlenou regeneraci jater po parciální hepatektomii (Ronco et al., 2002, Kimura et al., 2010, Uzun et al., 2009). Některé antioxidanty popř. hepatoprotektiva však vykazovaly inhibiční efekt, jak bylo ukázáno ve studiích s resveratrolem (Kirimlioglu et al., 2008), kurkuminem (Seehofer et al., 2010) a S-adenosylmethioninem (Kohoutek et al., 2010).

#### **1.1.4. Oxidační stres u nealkoholového ztukovatění jater (NAFLD)**

Nealkoholové ztukovatění jater (NAFLD, z anglického non-alcoholic fatty liver disease) patří mezi nejrozšířenější nemoci jater, zejména v rozvinutých zemích. NAFLD zahrnuje široké spektrum postižení jater od prosté steatózy přes nealkoholovou steatohepatitidu (NASH), fibrózu až po jaterní cirhózu. Zatímco jaterní komplikace NAFLD se týkají zejména pokročilejších forem tohoto onemocnění, zřejmě již i prostá steatóza je důsledkem faktorů, které jsou zodpovědné za rozvoj diabetes mellitus 2. typu a kardiovaskulárních chorob. Patogeneze NAFLD není zcela objasněna, ale oxidační stres zde hraje významnou roli (Gambino et al., 2011). Mezi možné mechanismy zvýšené tvorby ROS u NAFLD patří nedostatek mitochondriální ATP-syntázy, což posléze vede k sníženému obsahu ATP; dále nízký obsah redukovaného glutathionu (GSH) v intramitochondriálním kompartmentu (Vendemiale et al., 2001). Oxidace proteinů následovaná jejich odbouráváním může vysvětlit snížení antioxidační kapacity u NASH (Videla et al., 2004).

Bylo prokázáno, že myši s knockoutem genu pro transkripční faktor Nrf2 vykazovaly nejen zvýšení oxidačního stresu, ale rovněž zhoršení NAFLD (Chowdhry et al., 2010, Tanaka et al., 2008). Naopak genetická aktivace dráhy Nrf2 umožnila zpomalení rozvoje NAFLD (Zhang et al., 2010). Některé antioxidanty vykazovaly protektivní vliv proti rozvoji experimentálního NAFLD (Kuzu et al., 2008, Fiorini et al., 2005, Kim et al., 2012), avšak klinické studie schopné toto prokázat jsou zatím ojedinělé (Jadeja et al., 2014).

## **1.2 Antioxidanty**

Reaktivní formy kyslíku jsou tvořeny v malém množství i za fyziologických podmínek a jsou vychytávány endogenním antioxidačním systémem. Ten zahrnuje enzymy superoxiddismutázu (SOD), glutathionperoxidázu, katalázu a neenzymové systémy, které zahrnují malé molekuly, jako jsou vitamín C, vitamín E (Maiese et al., 2010) a glutathion (Dinkova-Kostova a Talalay, 2008). Oxidační stres může být zmírněn i nikotinamidem, což je forma niacinu (Feng et al., 2006).

Kromě uvedených tělu vlastních molekul vykazuje antioxidační účinek řada látek přírodních (Surh et al., 2008, Aggarwal a Shishodia, 2006, Kumar et al., 2014) i syntetických (Habeos et al., 2008, Hiranuma et al., 2007, Reisman et al., 2009a). Antioxidanty mohou být rozděleny na přímo a nepřímo působící, byť mnohé jsou schopny působit jedním i druhým způsobem (Dinkova-Kostova a Talalay, 2008).

#### **1.2.1. Přímo působící antioxidanty**

Přímo působící antioxidanty jsou obvykle molekuly o malé hmotnosti (např. vitamin C, E, glutathion, redukováná forma koenzymu Q10). Mohou vstoupit do redoxních reakcí a vychytat reaktivní formy kyslíku či dusíku. Přímo působící antioxidanty mají několik charakteristik: jsou aktivní v redoxních reakcích, jsou spotřebovány či chemicky pozměněny během jejich antioxidačního působení, a nakonec musí být doplněny či obnoveny (Dinkova-Kostova a Talalay, 2008). Příkladem jsou některé flavonoidy, kde dvojice hydroxylových skupin na fenolovém kruhu, zejména v orto-pozici, může sloužit jako donor elektronů (Mladenka et al., 2010). Tímto způsobem pak vznikne chinon (Muzolf-Panek et al., 2008). Některé chinony a semichinony se však samy mohou chovat jako radikály a vést tak k pro-oxidačním účinkům (Lambert a Elias, 2010). Rovněž povaha prostředí, konkrétně jeho lipofilita či hydrofilita, rozhoduje o pro- či antioxidačním účinku dané látky (Mladenka et al., 2010). Dalším příkladem části molekuly s přímou antioxidační aktivitou je sulfhydrylová skupina (Campo et al., 2001).

Navzdory uvedeným limitacím prokázaly přímo působící antioxidanty prospěšný účinek v některých modelech jaterního poškození, a to např. při regeneraci jater po parciální hepatektomii (Ronco et al., 2002, Kimura et al., 2010, Uzun et al., 2009), ischemicko-reperfúzním poškození (Hiranuma et al., 2007) či toxickém poškození jater (Campo et al., 2001, Jeong et al., 2002).



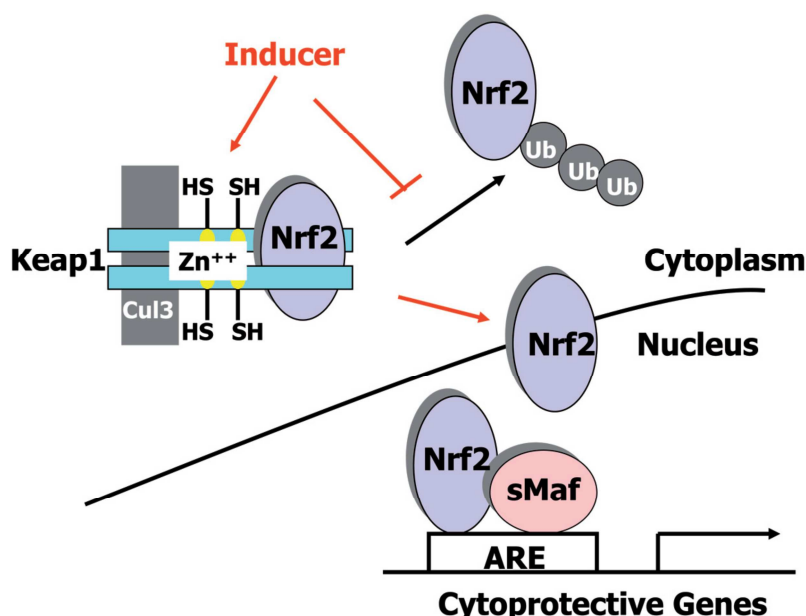
### 1.2.2. Nrf2 a nepřímo působící antioxidanty

Kromě přímo působících antioxidantů, které samy podlehnou oxidaci a mohou následně vykazovat pro-oxidační účinky, existují ještě antioxidanty nepřímo působící. Tyto jsou schopny indukovat proteiny s cytoprotektivním účinkem. Nepřímo působící antioxidanty se vyznačují následujícími rysy: nemusí vykazovat redoxní aktivitu a jejich účinek je zprostředkován upregulací cytoprotektivních proteinů. Mnoho z těchto proteinů má enzymovou aktivitu a tudíž nedochází k jejich spotřebování. Většinu takto katalyzovaných reakcí lze označit jako biotransformaci. Nepřímo působící antioxidanty navíc téměř nemají pro-oxidační účinky (Dinkova-Kostova a Talalay, 2008).

Tři komponenty regulují expresi cytoprotektivních proteinů:

1. *Antioxidant response elements* (ARE), což jsou specifické sekvence přítomné v regulačních oblastech genů pro enzymy účastnící se 2. fáze biotransformace;
2. *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (Nrf2), transkripční faktor zodpovědný za bazální i indukibilní expresi cytoprotektivních genů;
3. *Kelch-like ECH-associated protein 1* (Keap1), sensor a cíl pro induktory Nrf2.

(Surh et al., 2008, Dinkova-Kostova a Talalay, 2008)



Obrázek 2: Schéma aktivace a účinku transkripčního faktoru Nrf2.

Převzato z (Dinkova-Kostova a Talalay, 2008)

V současné době je dostupná celá řada látek, které aktivují Nrf2 a vykazují nepřímý antioxidační účinek (Surh et al., 2008, Jung a Kwak, 2010, Kumar et al., 2014). Příklady antioxidantů působících prostřednictvím aktivace transkripčního faktoru Nrf2 jsou uvedeny v Tabulce 2.

Tabulka 2. Nepřímo působící antioxidanty

Název látky	Reference
S-allylcystein	(Kalayarasan et al., 2008)
Epigalokatechingalát	(Shen et al., 2005, Sahin et al., 2010)
Kurkumin	(Aggarwal a Shishodia, 2006, Nishinaka et al., 2007)
Kyselina ferulová	(Ma et al., 2011, Ma et al., 2010)
Resveratrol	(Aggarwal a Shishodia, 2006, Khurana et al., 2013)
Sulforafan	(Kang et al., 2012a, Kleszczynski et al., 2013)
Silymarin	(Kim et al., 2012)

### 1.2.3. Epigalokatechingalát

Epigalokatechingalát (EGCG) je polyfenol ze zeleného čaje, který vykazuje přímý i nepřímý antioxidační účinek. Přímý antioxidační účinek je zprostředkován schopností podstoupit oxidaci na chinon (Lambert a Elias, 2010). Nepřímý účinek je dán regulací exprese mnoha Nrf2-dependentních i dalších genů (Shen et al., 2005).

V současnosti je EGCG využíván hojně jako potravní doplněk. Z látek obsažených v zeleném čaji je nejúčinnější složkou (Tipoe et al., 2010). Jeho protektivní účinek byl prokázán na různých modelech toxického poškození jater (Chen et al., 2004, Yasuda et al., 2009, Tipoe et al., 2010), nealkoholové steatózy a steatohepatitidy (Fiorini et al., 2005, Kuzu et al., 2008, Chung et al., 2012), jakož i na modelu ischemicko-reperfúzního poškození (Fiorini et al., 2005, Giakoustidis et al., 2010). EGCG rovněž zmírnil modelový diabetes mellitus, a to u ZDF potkanů a db/db myší (Wolfram et al., 2006), kteří se vyznačují poruchou leptinového receptoru respektive jeho úplným chyběním (Dubern a Clement, 2012). EGCG snižuje expresi genů pro glukoneogenezi, syntézu mastných kyselin, triacylglycerolů a cholesterolu (Wolfram et al., 2006, Collins et al., 2007).

EGCG je testován i jako potenciální inhibitor stárnutí – popsán je například antioxidační účinek u mozku potkanů (Srividhya et al., 2009).

Účinek EGCG na regeneraci jater po parciální hepatektomii nebyl v době přípravy našeho projektu popsán a bude předmětem popisovaného výzkumu.

#### **1.2.3.1.        Terapeutické a toxické dávky epigalokatechingalátu**

Pro prevenci akutního poškození jater jsou v literatuře používány různé dávky a cesty aplikace EGCG. Ve studii s akutním toxickým poškozením tetrachlormethanem u myší podávali autoři EGCG intraperitoneálně v dávce 50mg/kg resp. 75mg/kg po 3 dny (Chen et al., 2004). Ve studii s ischemicko-reperfúzním poškozením u myší s genotypem ob/ob podávali autoři EGCG v dávce 85mg/kg intraperitoneálně po dobu 2 dnů resp. rozpuštěné v pitné vodě po dobu 5 dnů (Fiorini et al., 2005). U potkaního modelu ischemicko-reperfúzního poškození podali autoři intraperitoneálně jednorázovou dávku 50mg/kg tělesné hmotnosti (Giakoustidis et al., 2010).

Výtažky ze zeleného čaje však nejsou zcela bez rizika. Opakovaně byly popsány případy akutního poškození jater způsobeného těmito přípravky (Molinari et al., 2006, Mazzanti et al., 2009, Chen et al., 2010). Výtažky ze zeleného čaje se tak dostaly až do online databáze hepatotoxických látek (NIDDK, 2014). Přestože tato poškození mohou být zčásti vysvětlena dalšími přísadami v těchto přípravcích (zejména kofeinem), má EGCG samotný další významné účinky, především na úrovni interakce s dalšími léčivy (Schonthal, 2011) a pro-oxidační účinek při podání velmi vysokých dávek (Galati et al., 2006, Mazzanti et al., 2009).

U myší byla dávka 120 mg/kg podaná intraperitoneálně hepatotoxická, dávka 150 mg/kg smrtelná pro 100 % zvířat (Galati et al., 2006). Dávka 1500 mg/kg podaná jednorázově gastrickou sondou vedla k úmrtí 85 % myší; dávka 750 mg/kg sice po jedné dávce k úmrtí nevedla, ale při opakovaném podání vedla k úmrtí 75 % myší (Lambert et al., 2010). V případě potkanů byla až dávka 2000 mg/kg podaná sondou do žaludku letální; dávka 200 mg/kg naproti tomu toxická nebyla (Isbrucker et al., 2006).

Studie na zdravých lidských dobrovolnících shledala jednorázovou dávku 1600 mg EGCG (tj. cca 22 mg/kg) jako bezpečnou a tolerovanou (Ullmann et al., 2003). Případné využití EGCG v klinických studiích je komplikováno variabilní biodostupností, ovlivněnou například stavem lačnosti/sytosti (Schonthal, 2011, Mereles a Hunstein, 2011).

### 1.3 Vliv genotypu na játra

V této části budeme hovořit o vlivu různých genotypů, a to jak přirozených, tak uměle vytvořených (knock-out, knock-down, knock-in).

#### 1.3.1. Role Nrf2

Exprese Nrf2 je nejvyšší v játrech a ledvinách, které mají biotransformaci jako jednu ze svých funkcí (Lewis et al., 2010, Kumar et al., 2014). Rozdíly v expresi jaterního Nrf2 se někdy přičítají rozdíly v délce života různých živočišných druhů (Yu et al., 2011, Figarska et al., 2014). Ne vždy je ale aktivace Nrf2 žádoucí: hyperaktivaci Nrf2 totiž můžeme potkat u buněk mnoha solidních nádorů (Kim et al., 2010, Yoo et al., 2012).

Práci zabývajících se vlivem Nrf2 na jaterní funkce u člověka je zatím poskrovnu. Nrf2 pravděpodobně přispívá k aktivaci jaterního CYP2C9 fenytoinem (Chaudhry et al., 2010). Polymorfismus genu Nrf2 na lokusu -617 zřejmě ovlivňuje míru exprese Nrf2 na úrovni mRNA a expresi prozánětlivých cytokinů TNF $\alpha$  a IL-1 $\beta$  na úrovni mRNA i proteinu po stimulaci lipopolysacharidem, alespoň tedy v bílých krvinkách pacientů s alkoholovou chorobou jater (Zhao et al., 2013).

Myši s vyřazením genu pro Nrf2 vykazují vyšší náchylnost k celé řadě poškození jater, například poškození brompropanem či chronickou konzumací etanolu (Kumar et al., 2014). Krmení myši bez Nrf2 vysokotukovou dietou vedlo k rozvoji nealkoholové steatózy (Tanaka et al., 2008), steatohepatitidy případně až cirhózy (Meakin et al., 2014). NAFLD způsobený dietou bez metioninu a cholinu byl výrazně horší u myši s vyřazeným Nrf2 (Chowdhry et al., 2010). Naopak aktivace Nrf2 pomocí knock-down genu pro Keap1 snižovala jaterní steatózu u myši krmených dietou bez metioninu a cholinu (Zhang et al., 2010). Nadměrné zvýšení oxidačního stresu u myši s knockoutem genu pro Nrf2 vedlo k resistenci na inzulin a inzulinu podobný růstový faktor, blokáde mitogeny aktivovaných kináz a ve výsledku ke zpomalení regenerace jater po parciální hepatektomii (Beyer et al., 2008, Dayoub et al., 2013).

Nrf2-KO myši byly rovněž náchylnější k poškození jater acetaminofenem (Enomoto et al., 2001, Reisman et al., 2009b). Naproti tomu myši s knock-down genu pro Keap1 a z toho vyplývající upregulací Nrf2 byly méně náchylné (Reisman et al., 2009b). Genetické odstranění proteinu Atg5 v myších játrech způsobilo inhibici autofagie a akumulaci proteinu p62. To pak vedlo k aktivaci Nrf2 prostřednictvím uvolnění Nrf2 z Keap1 a ochraně jater před poškozením acetaminofenem (Ni et al., 2012c).

### **1.3.2. Apolipoprotein E**

Nedávno byla popsána souvislost mezi genotypem apolipoproteinu E (ApoE) a expresí Nrf2 skupinou německých autorů. Ti popsali nižší množství Nrf2 v buněčném jádře a nižší expresi Nrf2-dependentních genů u transgenních myší nesoucích lidskou alelu ApoE4 než u myší nesoucích alelu ApoE3. Tyto rozdíly mohou být dány rozdíly v receptorech PPAR $\gamma$ . Jiným vysvětlením je více prozánětlivý stav u genotypu ApoE4 než u ApoE3, což je zprostředkováno zejména mikroRNA miRNA-125b a miRNA-144 (Graeser et al., 2011).

U pacientů s primární biliární cirhózou představoval genotyp ApoE4 riziko závažnější choroby a horší odpověď na léčbu než genotyp ApoE3 (Corpechot et al., 2001). Na druhou stranu, genotyp ApoE4 vykazoval v epidemiologických studiích nižší riziko NAFLD než genotyp ApoE3 (Demirag et al., 2007, De Feo et al., 2012). Vliv genotypu apolipoproteinu E na citlivost vůči acetaminofenu (paracetamolu) dosud popsán nebyl a bude předmětem druhé části této práce.

## **2. Cíle práce**

### **2.1 Část první: vliv epigalokatechingalátu na játra**

Cílem první části práce je zjistit, zda epigalokatechingalát (EGCG) podpoří regeneraci jater potkanů po 70% parciální hepatektomii. Rovněž budeme hodnotit vybrané signální dráhy. Součástí tohoto cíle bude i vyhodnocení účinku EGCG na hepatocyty potkana *in vitro*.

### **2.2 Část druhá: vliv genotypu apolipoproteinu E na hepatotoxicitu**

Cílem druhé části práce je porovnat citlivost primárních myších hepatocytů k acetaminofenu (paracetamolu). K tomu budou použity transgenní myši s implantovaným genem pro lidský apolipoprotein E3, myši s genem apolipoprotein E4 a wild-type myši. Rovněž porovnáme účinek acetaminofenu na mitochondriální membránový potenciál, markery oxidačního stresu, a nakonec i expresi vybraných genů dependentních na transkripčním faktoru Nrf2.

### **3. Materiály a metody**

#### **3.1 Část první: vliv epigalokatechingalátu na játra**

První část projektu byla zaměřena na pokusy v podmínkách *in vivo*, následovaly experimenty *in vitro*. Použité chemikálie a reagenty se v jednotlivých experimentech spadajících do první části práce neliší, budou proto popsány na začátku společně. Statistické metody byly shodné v první a druhé části, budou proto souhrnně popsány na konci druhé části.

##### **3.1.1 Použité chemikálie a reagenty**

Epigalokatechingalát (EGCG), 5-bromo-2-deoxyuridin (BrdU) a ostatní chemikálie byly, pokud není uvedeno jinak, v analytické čistotě a zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Monoklonální myší anti-BrdU protilátky pro imunohistochemické barvení byly zakoupeny od firmy DAKO (Glostrup, Denmark), sekundární anti-myší protilátky od firmy Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA, USA).

Myší Anti- $\beta$ -aktin, králíčí Anti-p21 CIP1 a sekundární kozí anti-králíčí IgG protilátky byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich. Kozí anti-DR5, králíčí p27 Kip1, králíčí Phospho-p53 (Ser15) od Cell Signaling (Beverly, MA, USA), myší Bcl-2 (C-2), kozí DR5 Antibody (M-20), sekundární kozí anti-myší IgG a oslí anti-kozí protilátky byly zakoupeny od firmy od Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA).

##### **3.1.2 Pokusná zvířata pro *in vivo* experiment**

V tomto experimentu byli použiti samci potkanů kmene Wistar (BioTest, Konárovice, Česká republika) s počáteční hmotností  $248 \pm 13$  g. Potkani byli ustájeni v prostředí o teplotě  $23 \pm 1$  °C,  $55 \pm 10$  % vlhkosti, výměna vzduchu 12–14krát za hodinu a 12hodinovým cyklem světlo-tma. Zvířata měla volný přístup k pitné vodě a byla krmena standardní laboratorní dietou ST-1 *ad libitum* (Velas, Lysá nad Labem, Česká republika). V souladu s platnou legislativou České republiky byly jak péče o zvířata, tak i experimentální protokol předem projednány, odsouhlaseny a kontrolovány Odbornou komisí pro zajišťování dobrých životních podmínek pokusných zvířat působící při Lékařské fakultě Univerzity Karlovy v Hradci Králové.

### 3.1.3 Protokol experimentu *in vivo*

Potkani podstoupili laparotomii (LAP, kontrolní skupina) nebo 70% parciální hepatektomii (PHx) v celkové eterové anestezii (Higgins a Anderson, 1931). Aqua pro injectione (AI) nebo EGCG v dávce 20 či 50 mg/kg tělesné hmotnosti byly aplikovány 3 po sobě jdoucí dny s tím, že třetí dávka byla aplikována bezprostředně po operaci. Dávkovací schéma vycházelo ze studie jiných autorů (Chen et al., 2004). Pokusná zvířata byla rozdělena do následujících pěti skupin:

- |                   |  |
|-------------------|--|
| (I – AI+LAP)      | Aqua pro injectione a laparotomie, n=6;              |
| (II – EGCG50+LAP) | EGCG v dávce 50 mg/kg a laparotomie, n=6;            |
| (III – AI+PHx)    | Aqua pro injectione a parciální hepatektomie, n=6;   |
| (IV – EGCG20+PHx) | EGCG v dávce 20 mg/kg a parciální hepatektomie, n=6; |
| (V – EGCG50+PHx)  | EGCG v dávce 50 mg/kg a parciální hepatektomie, n=6. |

Potkani byli usmrceni v celkové anestezii vykrvácením z břišní aorty, a to 24 hodin po operaci (tj. 4. den experimentu) s ohledem na maximum syntézy DNA v hepatocytech v tomto intervalu (Michalopoulos a DeFrances, 1997). BrdU pro určení syntézy DNA byl aplikován intraperitoneálně v dávce 50 mg/kg 1 hodinu před usmrcením. Krev a vzorky jater byly okamžitě po usmrcení zvířat zamrazeny a uschovány při -80°C až do analýzy. Část jater byla fixována v 4% neutrálním formaldehydu pro histologická barvení. Resekát jater získaný ze 3. dne experimentu a zbytek jater (tzv. remnant) ze 4. dne byly zváženy a míra růstu jater vypočítána podle vzorců, které jsme převzali z literatury, a to následujícími způsoby:

HRR hepatic regeneration rate (HRR)

$$\text{HRR} = [C - (A - B)] / A \times 100 [\%]$$

kde A je odhadovaná celková hmotnost jater v době parciální hepatektomie, B je hmotnost odstraněných jater (resekátu) a C je váha regenerujících jater na konci experimentu (Selzner a Clavien, 2000).

Liver regeneration rate (LRR):

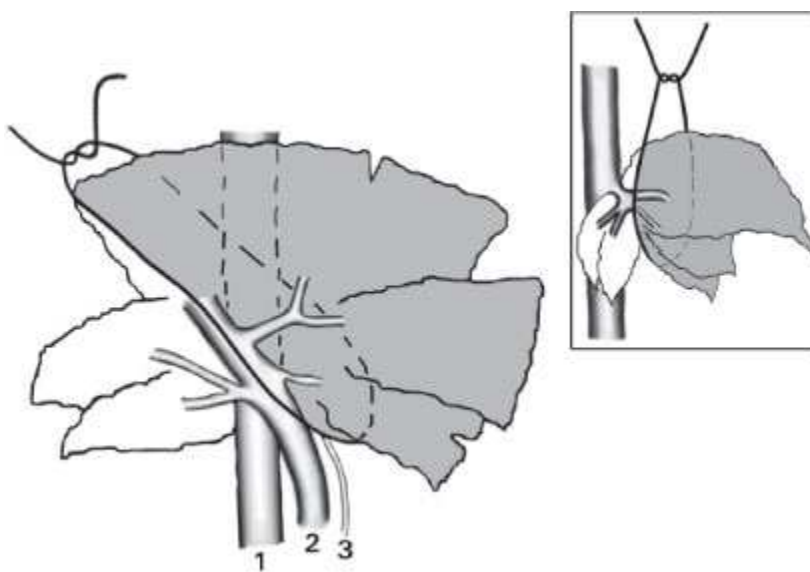
$$\text{LRR} = [C - (A - B)] / C \times 100 [\%]$$

kde A je odhadovaná celková hmotnost jater v době parciální hepatektomie, B je hmotnost odstraněných jater (resekátu) a C je váha regenerujících jater v době usmrcení zvířat (Murata et al., 2007).



### 3.1.3.1. Parciální hepatektomie

Model parciální hepatektomie u potkana byl zaveden před více než 80 lety (Higgins a Anderson, 1931). Před vlastním chirurgickým zákrokem provádíme celkovou inhalační anestezii éterem. Poté potkana pokládáme na záda a fixujeme všechny čtyři končetiny k operačnímu stolku. Před zahájením incize se nociceptivním podnětem přesvědčíme, zda anestezie účinkuje. Po předchozím navlhčení srsti provedeme horní střední laparotomii od *processus xiphoideus* kaudálně, a to maximálně v délce 2,5 cm. Laparotomii provádíme rovnými nůžkami po vrstvách. Výhodou řezu prováděného ve střední čáře je minimální krvácení. Z obou laterálních stran řezu vyvíjíme na břišní stěnu i na hrudní stěnu jemný tlak směrem mediálním, který má za cíl vytlačit z dutiny střední a levý laterální jaterní lalok. Tyto laloky od okolní tkáně izolujeme přestřižením ligament, a to *ligamentum falciforme*, *ligamentum teres hepatis* a *ligamentum triangulare*. Poté zakládáme pod laloky ligaturu (silon pletený 5EP, Chirmax, Praha, Česká republika). Ligaturu posunujeme co nejvýše do oblasti hilu, utáhneme a odstříhneme konce nitě. Podvázené laloky uchytíme do ruky a odstříháváme, a to těsně u ligatury. Tímto způsobem je jaterní tkáň redukována o 65 až 70%. Břišní stěnu šijeme po vrstvách (silon pletený 3EP, Chirmax).



Obrázek 3 – Schématické znázornění parciální hepatektomie u potkanů; menší obrázek znázorňuje laterální pohled. Tmavě označené laloky jsou odstraněny (Tannuri et al., 2007).

### 3.1.3.2. Usmrcení potkanů a odběr materiálu

Rovněž usmrcení potkanů provádíme v celkové inhalační anestezii éterem. I zde se před incizí přesvědčíme, zda je anestezie účinná. Dutinu břišní otevíráme řezem (stříhem) ve tvaru písmene V. Střeva odsouváme doprava. Retroperitoneální pojivo tupě rozvolňujeme (např. navlhčenými tampony) k obnažení břišní aorty a její bifurkace. Následuje odběr krve z bifurkace aorty, což zajistí usmrcení potkana a zároveň poskytne materiál k analýzám. Po preparaci ligament vyjmeme játra z dutiny břišní, opláchneme fyziologickým roztokem a zvážíme.



Obrázek 4 – Odběr krve z břišní aorty (foto: archiv HepEx)

### 3.1.4 Biochemie séra

Sérové koncentrace glukózy, celkového a konjugovaného bilirubinu, aktivity enzymů alanin aminotransferázy (ALT), aspartát aminotransferázy (AST) a alkalické fosfatázy u všech potkanů byly měřeny v automatických analyzátoch P800 Modular (Roche) na Ústavu klinické biochemie a diagnostiky, Fakultní nemocnice Hradec Králové. U hepatektomovaných zvířat (skupiny III, IV a V) byly měřeny rovněž plazmatické hladiny malondialdehydu (MDA).

### **3.1.5 Měření tkáňového glutathionu**

Část jater byla zhomogenizována v 10% ledové kyselině metafosforečné. Následovala centrifugace při 20 000 g po dobu 10 min ve 4°C. Glutathion v takto získaném supernatantu byl měřen fluorimetrickou metodou (Hissin a Hilf, 1976) s určitými modifikacemi (Rousar et al., 2012a). Redukovaný glutathion (GSH) byl exponován orto-ftalaldehydu a hydrogenfosfátovému pufru a fluorimetrická detekce provedena při následujících vlnových délkách:  $\lambda_{Ex}=340$  nm,  $\lambda_{Em}=420$  nm. Oxidovaný glutathion (GSSG) byl měřen po alkalické hydrolýze stejným způsobem jako GSH.

### **3.1.6 Měření tkáňového malondialdehydu**

Míra peroxidace lipidů v supernatantech z jaterních homogenátů byla provedena metodou TBARS, tj. měření látek reagujících s kyselinou thiobarbiturovou (Ohkawa et al., 1979). Jako činidlo byla použita směs obsahující 15% kyselinu trichloroctovou, 0,37% kyselinu thiobarbiturovou a 0,25% kyselinu chlorovodíkovou. 250  $\mu$ l tohoto činidla bylo smícháno s 250  $\mu$ l lyzátu a exponováno 15 minut teplotě 100°C. Následovalo ochlazení, centrifugace při 2500 rpm po dobu 5 minut. Ze získaného supernatantu bylo odpipetováno 150  $\mu$ l v duplikátech do jamek mikrotitrační destičky a absorbance byla měřena při vlnové délce 535 nm.

### **3.1.7 Měření tkáňových cytokinů**

Měření tkáňových cytokinů předcházela homogenizace části jater v RIPA pufru a centrifugaci na 10 000 g a kvantifikace celkového obsahu proteinů Bradfordovou metodou s hovězím albuminem jako standardem (Bradford, 1976). V takto získaném supernatantu byla měřena koncentrace cytokinů TNF- $\alpha$ , IL-1 a TGF- $\beta$ 1 příslušnými kity od eBioscience (San Diego, CA, USA): Rat TNF-alpha Platinum ELISA, Rat IL-1 beta Platinum ELISA a Rat TGF-beta1 Platinum ELISA.

### **3.1.8 Aktivita kaspáz 3/7 v homogenátu**

Aktivita kaspáz 3 a 7 byla měřena za použití kitu Caspase-Glo™ 3/7 od firmy Promega (Madison, WI, USA). Vzorek jater byl homogenizován v následujícím roztoku: 20 mM HEPES, pH 7,5, 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM dithiotreitol, 100 μM fenylmetansulfonylfluorid, 10 μg/ml leupeptin, 2 μg/ml aprotinin (Walsh et al., 2008). Homogenát byl centrifugován po dobu 15 minut na 16 060 g ve 4 °C. Obsah bílkovin v supernatantu byl změřen Bradfordovou metodou. Vzorky pak byly naředěny na koncentraci bílkovin 10 μg/ml (Liu et al., 2004). Následovala inkubace po dobu 2 hodin s Caspase-Glo™ Reagent, který obsahuje substrát pro kaspázy 3 a 7, vždy 50 μl vzorku a 50 μl Reagentu (Seifrtova et al., 2012). Následná luminiscence byla měřena na spektrofotometru TECAN Infinite M200 (Tecan Group, Männedorf, Švýcarsko).

### **3.1.9 Expres proteinů p21, p-p27, p-p53, Bcl-2**

Expres genů p21, p-p27 a p-p53 na úrovni proteinu byla měřena metodou Western Blot. Předcházela homogenizace (Walsh et al., 2008) a určení obsahu proteinů (Bradford, 1976). Lyzáty byly napipetovány do jamek v množstvích obsahujících 10 μg bílkoviny. Následovala separace elektroforézou SDS-PAGE za použití gelu NuPAGE® Novex® Bis-Tris Mini gels 4 – 12% (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) a přenos na nitrocelulózovou membránu (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Membrány byly inkubovány s příslušnými primárními protilátkami ve 4°C přes noc a se sekundárními protilátkami po 2 hodiny při pokojové teplotě. Vizualizace byla provedena za použití chemiluminiscenčního kitu (Roche, Penzberg, Německo) a fotografického filmu (Foma, Hradec Králové, Česká republika). Shodný obsah proteinu byl potvrzen reinkubací s protilátkami proti β-aktinu. Příprava se lišila pro protein Bcl-2: zde byl použit více koncentrovaný homogenát jater v RIPA pufru (popsaný v odstavci 3.1.7).

### 3.1.10 Exprese RNA genů HO-1 a Nqo-1

Expresi genů hemoxygenázy-1 (HO-1) a NAD(P)H-chinon-oxidoreduktázy-1 (Nqo-1) na úrovni mRNA byla měřena dle dřívějšího popisu (Hirsova et al., 2012) s tím rozdílem, že celková RNA z jaterní tkáně byla izolována metodou fenol-chloroformové extrakce za použití kitu RNA Blue (TOP-Bio, Praha, Česká republika). TaqMan Fast Universal PCR Master Mix a předpřipravené TaqMan Gene Expression Assay kity byly zakoupeny od Life Technologies (Carlsbad, CA, USA), primery a próby od Geneti Biotech (Hradec Králové, Česká republika). Glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenáza byla použita jako referenční gen.

### 3.1.11 Histopatologická analýza

Po usmrcení potkanů byly části jater ihned fixovány vložím do 4% neutrálního formaldehydu. Parafrínové řezy byly barveny hematoxylinem-eozinem. Byly kontrolovány známky steatózy a zánětu. Dále byla hodnocena přítomnost apoptotických tělísek patologem, který byl zaslepený vůči studii (Seabra et al., 2012).

Imunohistochemické barvení bylo popsáno v předchozích studiích (Bader et al., 2011). Parafrínové řezy byly inkubovány s monoklonální protilátkou proti BrdU, poté s příslušnou sekundární protilátkou a konjugovanou peroxidázou (Dako, Glostrup, Dánsko). Vizualizace navázané protilátky byla provedena použitím 3,3'-diaminobenzidin-tetrahydrochloridu a hydroxidu vodíku. Inkorporace BrdU byla semikvantitativně spočítána jako počet pozitivních hepatocytů na zorné pole, celkem v 9 reprezentativních zorných polích. Použité zvětšení bylo 100x, mikroskop Olympus IX51 (Olympus Imaging Corp., Tokyo, Japonsko). Mikrofotografie byly pořízeny programem Quick Photo Camera 3.0 (Promicra, Praha, Česká republika), ke kvantifikaci BrdU positivity byl použit program NIS-Elements AR 2.30 (Nikon, Lewisville, TX, USA).

### 3.1.12 Pokusná zvířata pro *in vitro* experimenty

Dále jsme pokračovali, i s ohledem na zásadu 3R, v experimentech *in vitro*. Potkaní samci kmene Wistar (hmotnost  $237 \pm 35$  g) byli zakoupeni od firmy Velas (Lysá nad Labem, Česká republika). Podmínky chovu byly popsány v odstavci 3.1.2.

### 3.1.13 Protokol experimentu *in vitro*

Potkani podstoupili buď parciální hepatektomii popsanou v části 3.1.3.1 nebo laparotomii (kontroly). Všechny operační postupy byly provedeny v celkové inhalační anestezii éterem. 24 hodin od operace byly provedeny izolace hepatocytů.

### 3.1.14 Izolace potkaních hepatocytů

K izolaci hepatocytů byla použita metoda dvoustupňové kolagenázové perfúze (Berry et al., 1991, Kucera et al., 2012a). Izolaci předchází celková inhalační anestezie éterem a upevnění na operační stůl. Dutina břišní je otevírána řezem/střihem ve tvaru písmene V, který nám zajistí dobrý přístup do dutiny břišní.



Obrázek 5 – Otevření dutiny břišní „V střihem“ (foto: archiv HepEx)

Orgány dutiny břišní jsou následně opatrně odsunuty k levé straně těla zvířete, čímž se odkryje přístup k dolní duté žíle, do níž aplikujeme heparin ve fyziologickém roztoku (200 IU na 100 g hmotnosti potkana). Tupou preparací uvolňujeme v. portae a nachystáme ligaturu pro upevnění kanyly. Poté do portální žíly zavádíme kovovou kanylu (obr. 5) a upevňujeme ligaturou. Kanyla je napojena na perfúzní aparaturu naplněnou perfúzním roztokem temperovaným na 37°C a nasyceným karbogenem (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>). V hadicích nesmějí být přítomny vzduchové bubliny, abychom předešli vzduchové embolii větví v. portae.



Obrázek 6 – Kanylace portální žíly (foto: archiv HepEx)

Nejprve je provedena perfúze *in situ* roztokem bez obsahu vápenatých iontů – roztok A (přesné složení v Tabulce 3). O úspěšnosti perfúze svědčí rychlé, homogenní odbarvení jater a postupné zvětšování jejich objemu. Po chvíli přívod perfúzního roztoku zastavujeme a prostřiháváme dolní dutou žílu. Poté vyjmeme játra z dutiny břišní, opláchneme je v kádince s fyziologickým roztokem, upevníme je do speciálního stojánku a dokončíme jejich proplach roztokem A (obr. 6).



Obrázek 7 – Upevnění jater ve stojánku (foto: archiv HepEx)

Pokračujeme recirkulační perfúzí jater roztokem s obsahem kolagenázy (Seva, Heidelberg, Německo, 0.12 PZU/mg) a vápenatých iontů (roztok B, Tab. 3). Optimální doba této perfúze je 14 minut. Stálý perfúzní tlak v obou stupních promývání je zajištěn výškou sloupce perfúzního roztoku (cca 40 cm). Po ukončení recirkulační perfúze se játra ponoří do Krebs-Henseleitova média s bovinním sérovým albuminem (roztok C, Tab. 3) a jaterní tkáň se jemně mechanicky rozvolní. Získaná suspenze buněk je přefiltrována přes sterilní 4x složenou gázu do centrifugační zkumavky a centrifugována po dobu 5 minut na 28 g při 4 °C. Supernatant je odsát či opatrně odlit a buňky znovu resuspendovány v roztoku C. Následuje centrifugace za stejných podmínek a celý postup je pak ještě jednou opakován.

Tabulka 3. Roztoky pro izolaci hepatocytů

<b>Roztok A</b> (třeba 250 ml)	8 g NaCl; 0,4 g KCl; 0,0977 g MgSO <sub>4</sub> .xH <sub>2</sub> O; 0,1206 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O; 0,06 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 2,188 g NaHCO <sub>3</sub> ; 0,19 g EGTA, do 1000 ml doplněno destilovanou vodou, 7 min. syceno karbogenem, výsledné pH 7,3 – 7,4.
<b>Roztok B</b> (třeba 200 ml)	4,8 g NaCl; 0,24 g KCl; 0,05862 g MgSO <sub>4</sub> .xH <sub>2</sub> O; 0,07236 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O; 0,036 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 0,3528 g CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O, 1,314 g NaHCO <sub>3</sub> ; doplněno do 600 ml destilovanou vodou, 7 min. syceno karbogenem (95 % O <sub>2</sub> + 5 % CO <sub>2</sub> ), výsledné pH 7,3 – 7,4; obvykle používáme 0,055 g surové kolagenasy do 200 ml recirkulačního roztoku. Pozn.: množství použité kolagenázy se může lišit dle šarže.
<b>Roztok C</b> (Krebs – Henseleitovo médium)	6,9 g NaCl; 0,36 g KCl; 0,1441 g MgSO <sub>4</sub> .xH <sub>2</sub> O; 0,13 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 0,374 g CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O; 2g NaHCO <sub>3</sub> ; 0,9 g glukózy, doplněný do 1000 ml destilovanou vodou pro infúze. 1,333 g albuminu do 100 ml C roztoku pro práci s izolovanými buňkami.



Viabilita byla určena pomocí Trypanové modři (Trypan blue exclusion test); ve všech izolacích byla vyšší než 90%. Buněčná denzita byla spočítána pomocí přístroje Cellometer (Nexcelom Bioscience, Lawrence, MA, USA). Poté byla suspenze hepatocytů naředěna kultivačním médiem Williams E medium obohaceným o 6% fetální hovězí sérum (Merck Millipore, Berlin, Německo), glutamin (2 mmol/l), penicilin (100 IU/ml), streptomycin (10 mg/ml), inzulin (0,08 IU/ml), prednisolon (0,5 µg/ml) a glukagon (0,008 µg/ml) na cílovou denzitu:  $2 \times 10^5$  pro většinu analýz,  $6 \times 10^5$  pro snímky ve fázovém kontrastu,  $2 \times 10^6$  pro měření proteinové exprese. Buňky byly nasázeny na kolagenem pokryté kultivační 6jamkové (1 ml na jamku), 24jamkové (0,3 ml) a 96jamkové (0,1 ml) destičky NUNC plates (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Následovala doba nutná pro přichycení buněk (tzv. seeding) po dobu 3 hodin. Poté bylo odstraněno medium a vyměněno za nové Williams E (tentokrát bez sera) s různými koncentracemi EGCG od 1 µmol/l do 15 µmol/l. Buňky byly poté inkubovány při 37°C v atmosféře s 5% CO<sub>2</sub>.

### 3.1.15 Morfologické zhodnocení

Nativní snímky ve fázovém kontrastu byly zhotoveny při 400násobném zvětšení po 24hodinové kultivaci, a to pomocí mikroskopu Olympus IX51 a programu Quick Photo Camera 3.0. Hodnotili jsme známky buněčného poškození, zejména uvolnění buněk z kolagenu, kulovitý tvar buněk, tzv. „blebbing“ plazmatické membrány (viz obr. 7), zvýšenou granulaci cytoplazmy a ztrátu viditelnosti jádra (Kucera et al., 2012a).



Obrázek 8 – Mikrofotografie čerstvě izolovaného hepatocytu s četnými *blebs* (foto: archiv HepEx)

### **3.1.16 Testy viability: WST-1 test, aktivita LDH, syntéza albuminu**

Aktivita nitrobuněčných dehydrogenáz byla měřena po 24 hodinách kultivace metodou WST-1. Zkratka znamená water-soluble tetrazolium salts. Principem testu je chemická přeměna reagensia (tetrazoliových solí) na barevné formazany, jejichž koncentrace může být kvantifikována spektrofotometricky. Tato metoda zachycuje aktivitu buněčných dehydrogenáz v živých, ale nikoliv mrtvých buňkách (Mosmann, 1983). Praktické provedení spočívalo v odstranění média a přidání WST-1 substrátu Cell Proliferation Reagent WST-1 (Roche, Penzberg, Německo) naředěného v poměru 1:10 s médiem Williams E. Buňky byly s tímto reagens inkubovány v atmosféře s 5% CO<sub>2</sub> o teplotě 37°C (Stankova et al., 2010). Absorbance byla změřena v čase 0 (tj. bezprostředně po přidání reagens) a po 2 hodinách inkubace za pomoci spektrofotometru TECAN Infinite M200. Rozdíl mezi těmito hodnotami byl využit pro statistické zhodnocení.

Aktivita laktátdehydrogenázy (LDH) byla měřena v médiu i v buněčném lyzátu za použití kitu od firmy DiaSys (Holzheim, Německo). Abychom docílili lýzy buněk, odstranili jsme médium, ponechali buňky 10 minut při teplotě -80°C, poté přidali destilovanou vodu a buňky seškrábali. Poměr extracelulární aktivity LDH (tj. v kultivačním médiu) a celkové LDH aktivity je dále označován jako LDH leakage, doslova tedy únik LDH.

Dalším z testů buněčné viability bylo měření produkce albuminu. Ten byl detekován v médiu pomocí kitu Rat Albumin ELISA Quantitation Set od Bethyl Laboratories (Montgomery, TX, USA) dle pokynů výrobce.

### **3.1.17 Markery oxidačního stresu: malondialdehyd a DCFDA**

Produkce reaktivních forem kyslíku (ROS) byla měřena pomocí fluorescenční próby dichlorodihydrofluoresceindiacetátu (DCFDA) od firmy Life Technologies (Carlsbad, CA, USA). Po odstranění média byl přidán substrát naředěný v kultivačním médiu v koncentraci 1 µmol/l. Následovala 60minutová inkubace při 37°C v atmosféře s 5% CO<sub>2</sub> o teplotě 37°C, poté byl substrát odstraněn a jamky mikrotitrační destičky propláchnuty médiem. Po další 45minutové inkubaci byla měřena fluorescence uvolňovaná z horní části destičky. Excitační a emisní vlnové délky byly 485 respektive 535 nm.

Měření malondialdehydu (MDA) v médiu využívalo princip TBARS (Ohkawa et al., 1979) a tudíž se svým postupem nelišilo od odstavce 3.1.6.

### **3.1.18 Aktivita kaspáz 3 a 7**

Aktivita kaspáz 3 a 7 byla měřena pomocí kitu Caspase Glo 3/7 od firmy Promega. Přidání Caspase Glo Reagent navodilo lýzu buněk a zároveň poskytlo luminiscenční substrát pro kaspázy 3 a 7. Takto vytvořený signál je úměrný aktivitě kaspáz. K buňkám na mikrotitrační destičce s 50  $\mu$ l kultivačního média bylo přidáno po 50  $\mu$ l Caspase Glo Reagent, jak bylo popsáno dříve (Seifrtova et al., 2012). Poté byly buňky inkubovány při 37°C v atmosféře s 5% CO<sub>2</sub> o teplotě 37°C. Celková luminiscence byla měřena na spektrofotometru TECAN Infinite M200 v luminiscenčním režimu v časech 0 min, 60 min a 120 min; součet těchto hodnot byl použit pro statistické hodnocení.

### **3.1.19 Syntéza DNA**

Syntéza DNA byla měřena pomocí kitu BrdU Cell Proliferation ELISA Kit (colorimetric) od firmy Abcam (Cambridge, UK) podle pokynů výrobce. 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) byl přidán do média 24 hodin před měřením. Bezprostředně před měřením byly buňky fixovány a vystaveny postupně primární protilátce (proti BrdU), sekundární protilátce a substrátu pro peroxidázu; mezi jednotlivými kroky byly jamky mikrotitrační destičky promývány. Nakonec byla měřena absorbance při vlnové délce 450 nm.

### **3.1.20 Exprese proteinů p-p53, Bcl-2 a DR5**

Po odstranění média byla provedena lýza buněk za pomoci pufru Cell Lysis Buffer od firmy Cell Signaling Technology obohaceného o proteázový inhibitor cOmplete Mini a fosfatázový inhibitor PhosSTOP, obojí od firmy Roche. Obsah proteinů byl měřen metodou dle Bradforda a vzorky naředěny tak, aby každý vzorek obsahoval 35  $\mu$ g bílkoviny. Následovalo měření Western Blotem, jak bylo popsáno v části 3.1.9., s protilátkami proti fosforylovanému p53, Bcl-2 a death receptoru TRAILR2/DR5.  $\beta$ -aktin a barvení Ponceau Red byly použity jako kontroly stejné koncentrace bílkovin (tzv. loading control).

### **3.1 Část druhá: vliv genotypu apolipoproteinu E na hepatotoxicitu**

V této části jsme se zabývali vlivem genotypu apolipoproteinu E na hepatotoxicitu.

#### **3.2.1 Použité chemikálie a reagentia.**

Kolagenáza (lot 120296, 0.12 PZU/mg) byla získána od firmy Seva (Heidelberg, Německo). Anestetikum ketamin (Narketan) bylo zakoupeno od firmy Vétoquinol (Lure Cedex, Francie) xylazin (Rometar) od firmy Bioveta (Ivanovice na Hané, Česká republika). Reagentia a kity jsou popsány v příslušných odstavcích.

Myší Bcl-2 protilátka, králičí anti-Mcl-1, králičí anti-CYP2E1 a králičí anti-phospho-4EBP1 byly zakoupeny od firmy Santa Cruz Biotechnology. Myší anti- $\beta$ -aktin byl zakoupen od firmy Sigma-Aldrich. Sekundární kozí anti-králičí a kozí anti-myší IgG byly zakoupeny od Santa Cruz Biotechnology.

Všechny ostatní chemikálie byly v analytické čistotě a objednány od firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

#### **3.2.2 Zvířata**

Samice myší s nahrazeným endogenním (myším) genem pro apolipoprotein E (dále jen ApoE) lidským ApoE3 nebo ApoE4 genem na genetickém pozadí C57Bl/6 background byly objednány od firmy Taconic (Hudson, NY, USA). Myši v době experimentu vážily  $20,2 \pm 1,3$  g a byly staré 7 až 9 týdnů. Samice C57Bl/6 stejného věku, zakoupené od firmy Velaz (Únětice, Česká republika), byly použity jako wild-type (WT) kontroly. Podmínky chovu byly shodné s podmínkami popsány v odstavci 3.1.2. Experiment byl schválen Odbornou komisí pro zajišťování dobrých životních podmínek pokusných zvířat působící při Lékařské fakultě Univerzity Karlovy v Hradci Králové a Ministerstvem zemědělství České republiky.

### 3.2.3 Izolace myších hepatocytů

Před vlastní izolací byly myši narkotizovány éterem a poté jim byla aplikována intraperitoneálně směs ketaminu (100 µg/g tělesné hmotnosti) a xylazinu (10 µg/g tělesné hmotnosti) rozpuštěné ve vodě pro injekce (aqua pro injectione). Hepatocyty byly izolovány metodou dvoustupňové kolagenázové perfúze, jak popsali Bajt et al. (2004) s malými úpravami. Před otevřením dutiny břišní byl intraperitoneálně aplikován heparin (0,5 IU/g tělesné hmotnosti) k zabránění krevního srážení během následujících kroků. Po otevření dutiny břišní bylo přerušeno *ligamentum falciforme hepatis* a odstraněn žlučník. Portální žíla byla poté kanylována 20G jehlou a játra propláchnuta *in situ*, nejprve roztokem bez obsahu vápníku po dobu 3 minut, poté s roztokem obsahujícím kolagenázu (1 mg/ml). Jakmile získala játra houbovitý vzhled (tj. po 8-10 minutách), byla vyňata a mechanicky rozrušena do vzniku suspenze hepatocytů. Ta pak byla pročištěna filtrací přes sterilní gázu a pomocí opakované centrifugace na 28 g při 4°C.

Buněčná viabilita byla určena pomocí Trypanové modři a ve všech izolacích byla vyšší než 80%. Buněčná densita byla hodnocena pomocí přístroje Cellometer. Poté byla suspenze naředěna médiem Williams E obohaceným o 6% fetální hovězí sérum (Merck Millipore, Berlin, Německo), glutamin (2 mmol/l), penicilin (100 IU/ml), streptomycin (10 mg/ml), inzulin (0,08 IU/ml), dexametazon (0,12 µg/ml) a glukagon (0,008 µg/ml) na cílovou denzitu  $4 \times 10^5$  buněk na ml. Po 2 hodiny bylo buňkám umožněno přichytit se na kolagenované mikrotitrační destičky 6jamkové (2 ml na jamku), 12jamkové (1 ml na jamku), 24jamkové (0,3 ml) a 96jamkové (0,1 ml) NUNC plates (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Poté bylo odstraněno médium a přidáno nové Williams E, tentokrát bez obsahu bovinního či jiného séra, s koncentracemi acetaminofenu od 0,5 mmol/l do 4 mmol/l. Buňky byly inkubovány při 37°C v atmosféře s 5% CO<sub>2</sub> po dobu 24 hodin.

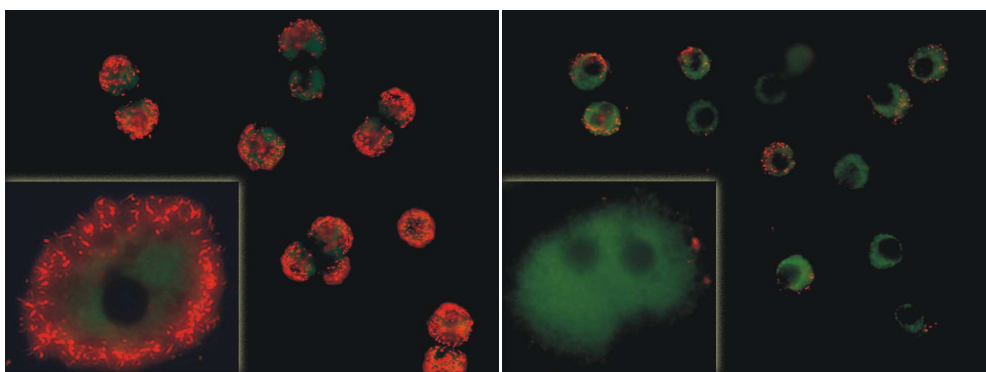
### 3.2.4 Mikroskopické zhodnocení

Všechny snímky byly pořízeny za použití mikroskopu Olympus IX51 s fotoaparátem E-600 Digital Camera a softwaru Quick Photo Camera 3.0. Měřítka, šipky a popisky byly přidány pomocí programu Quick Photo Camera; žádné jiné úpravy na snímcích prováděny nebyly. Zvětšení objektivu byl buď 20x nebo 40x (bude upřesněno v popiscích jednotlivých obrázků). Všechna barvení popsána níže byla prováděná při pokojové teplotě.

Snímky ve fázovém kontrastu byly pořízeny po 4hodinové a 24hodinové inkubaci.

Pro semi-kvantifikaci přítomnosti lipidů jsme použili kit Steatosis Colorimetric Assay (Cayman Chemical Comp., Ann Arbor, MI, USA), který je založený na barvení olejovou červení (Oil Red O). Haematoxylin byl použit pro dobarvení buněčných jader. V režimu světlého pole (bright field) jsme určovali počet buněk s oranžově červenou cytoplazmou. Pozitivní buňky byly počítány alespoň v 10 zorných polích; alespoň 500 buněk od každého genotypu bylo zahrnuto. Poté jsme vypočítali procento pozitivitu u jednotlivých genotypů.

Mitochondriální membránový potenciál byl hodnocen pomocí barvení JC-1 Dye (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), jak bylo popsáno dříve (Kučera et al., 2014). Buňky byly inkubovány 45 minut při 37°C s 10  $\mu$ M barvivem JC-1 rozpuštěným v kultivačním médiu. Po promytí byly buňky fotografovány ve fluorescenčním módu. JC-1 je barvivo, které se hromadí v mitochondriích. V nízkých koncentracích vykazuje zelenou fluorescenci, ve vysokých tvoří agregáty, mění se vlnová délka a tudíž i barva. Emisní maxima byla 595 nm pro mitochondrie s nízkým mitochondriálním membránovým potenciálem (zelená) a 525 nm pro mitochondrie s vysokým mitochondriálním membránovým potenciálem (oranžová) – viz Obrázek 9. Alespoň 230 buněk bylo zahrnuto v každém genotypu a koncentraci. Bylo vypočítáno procento buněk s vysokým membránovým potenciálem.



Obrázek 9 – mikrofotografie hepatocytů po použití fluorescenční barvy JC-1.

Vlevo – intaktní hepatocyty s vysokým mitochondriálním membránovým potenciálem, vpravo – hepatocyty poškozené se sníženým mitochondriálním membránovým potenciálem (foto: archiv HepEx)

### **3.2.5 Testy viability: WST-1, aktivita LDH**

Testy buněčné viability využívaly stejných metod, které jsou popsány v odstavci 3.1.16. V případě metody WST-1 jsme zvolili 60minutovou inkubaci s uvedeným Cell Proliferation Reagent WST-1 a rovněž zde vypočítali rozdíl počáteční a konečné absorbance. V případě měření aktivity laktátdehydrogenázy byl postup odlišný v tom, že jsme k lýze buněk použili Cell Lysis Buffer (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA).

### **3.2.6 Markery oxidačního stresu: DCFDA a MDA**

Při hodnocení tvorby reaktivních forem kyslíku jsme použili stejné metody, které jsou popsány v odstavci 3.1.17 a v reference (Kučera et al., 2014) s tím rozdílem, že jsme buňky s DCFDA činidlem inkubovali 55 minut.

Měření obsahu malondialdehydu (MDA) bylo i zde založeno na měření látek reagujících s kyselinou tiobarbiturovou (TBARS) v kultivačním médiu (Ohkawa et al., 1979).

### **3.2.7 Metabolismus glutathionu**

Obsah redukovaného glutathionu (GSH) byl měřen po 4hodinové a 24hodinové inkubaci s APAP. Médium bylo odstraněno a buňky lyzovány přidáním destilované vody. Poté byla přidána 5% kyselina metafosforečná o teplotě 4°C a vzorky odstředěny na 20 000 g při 4 °C. Hladiny GSH v takto získaném supernatantu byly měřeny modifikovanou fluorimetrickou metodou (Rousar et al., 2012a).

Příprava vzorků byla identická pro měření konjugátu APAP s glutathionem (APAP-SG). Koncentrace konjugátu APAP-SG byly měřeny hmotností spektrometrií (Rousar et al., 2012b).

### **3.2.8 Aktivita kaspáz 3 a 7**

Aktivita kaspáz 3 a 7 byla měřena po 4hodinové a 24hodinové kultivaci s APAP pomocí kitu Caspase Glo 3/7 (Promega). Po odstranění média byly buňky vystaveny Caspase Glo 3/7 reagens, které zajistilo lýzu buněk a poskytlo substráty pro kaspázy 3 a 7. Celková luminiscence byla měřena v čase 0 min, 60 min a 120 min.

### 3.2.9 Izolace proteinů a Western blot

Po odstranění média byla provedena lýza buněk za pomoci pufru Cell Lysis Buffer, jak je popsáno v části 3.1.20. Vzorky byly naředěny tak, aby každá dráha nesla 30 µg bílkoviny. Následovalo měření metodou Western Blot, jak bylo popsáno v části 3.1.9. K určení density proužků byl použit software Quantity One 4.6 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

### 3.2.10 Izolace RNA a kvantitativní real-time PCR

Celková RNA ze suspenze hepatocytů (zbytek, který nebyl nasázen na kultivační destičky) a ze 6jamkových kultivačních destiček exponovaných po dobu 24 hodin byla izolována metodou fenol-chloroformové extrakce za pomoci kitu RNA Blue (Top-Bio, Praha, Česká republika). Poté byla celková RNA z každého vzorku reverzně přepsána za pomoci oligo-dT primerů (Generi Biotech, Hradec Králové, Česká republika) a M-MLV reverzní transkriptázy (Top-Bio) podle pokynů výrobců. Měřené geny byly glutathion S-transferáza 2 (Gsta2), hemoxygenáza-1 (Hmox1), NAD(P)H dehydrogenáza, chinon 1 (Nqo1). Design primerů je nastíněn v Tabulce 4. Abychom se vyvarovali kontaminaci genomickou DNA, primery byly navrženy tak, aby přesahovaly hranice exonů. Hydrolyzační próby byly značeny fluorescenčním barvivem FAM. Výběr referenčních (housekeeping) genů vycházel z experimentální validace jejich expresní stability:

Beta 2-mikroglobulin (B2m) a Polypeptidová A RNA-Polymeráza II (Polr2a). Kvantitativní real-time RT-PCR byla provedena na cykleru CFX96 Touch (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) s následujícími podmínkami amplifikace: 95 °C po dobu 3 min, a 50 cyklů s teplotou 95 °C po dobu 10 s a 60 °C po dobu 20 s. Každý vzorek cDNA byl analyzován v PCR triplikátech.

Software REST 2009 V2.0.13 (QIAGEN GmbH, Hilden, Německo) byl použit ke zhodnocení statisticky významných rozdílů v genové expresi a určení relativních poměrů exprese (Pfaffl et al., 2002).



Tabulka 4. Kvantitativní RT-PCR – design primerů

Oficiální označení genu	qPCR kód výrobce (GENERI BIOTECH s.r.o.)	Reference sekvence	Rozsah exonů
Referenční (housekeeping) geny			
B2m	mB2m_Q1	NM_009735	1 / 2
Polr2a	mPolr2a_Q1	NM_009089	22 / 23
Měřené geny			
Gsta2	mGsta2_Q2	NM_008182	5 / 6
Hmox1	mHmox1_Q1	NM_010442	4 / 5
Nqo1	mNqo1_Q1	NM_008706	5 / 6

### 3.2.11 Statistické zhodnocení

Hepatocyty byly izolovány opakovaně, celkem třikrát u myší ApoE4 a wild-type kontrol a dvakrát u ApoE3 myší. Reprezentativní výsledky jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  výběrová směrodatná odchylka (SD); počty jamek jakožto technických replikátů jsou v tabulkách a obrázcích označeny jako n. Všechny statistické analýzy byly provedeny pomocí programu GraphPad Prism 6.01 (La Jolla, CA, USA). Tento program byl rovněž využit ke tvorbě grafů. Hodnoty byly nejprve testovány na normalitu pomocí Kolmogorov-Smirnoffova testu. Data s gaussovským rozdělením byla dále analyzována pomocí testu ANOVA a Tukeyho posttestem. Data s negaussovským rozdělením byla analyzována pomocí Kruskal-Wallisova testu, zatímco Dunnův posttest byl použit pro mnohonásobná srovnávání.  $p < 0,05$  byla považována za statisticky významnou.

## 4. Výsledky

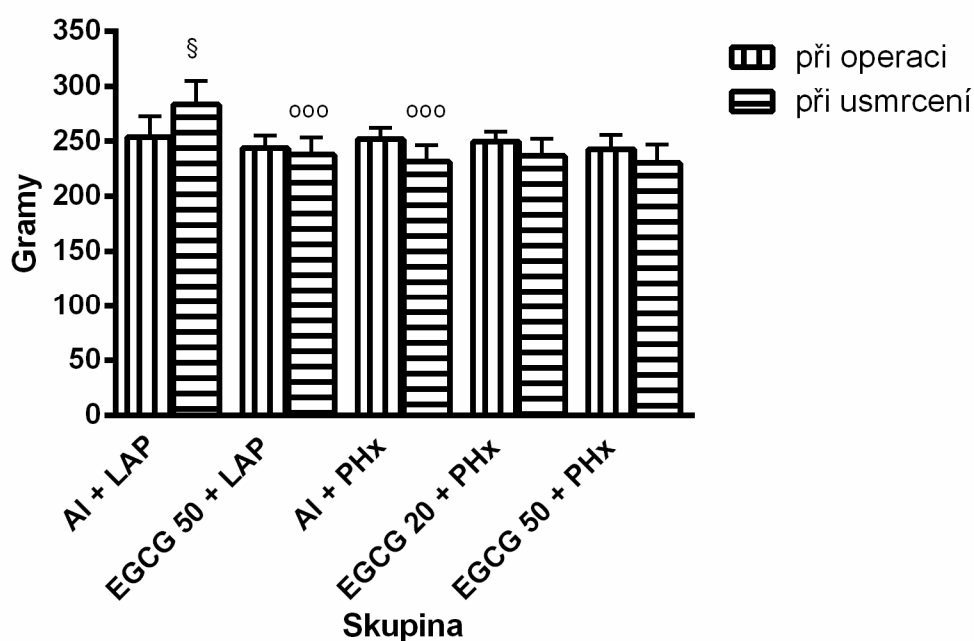
### 4.1 Část první: vliv epigalokatechingalátu na játra

Nejprve budou popsány výsledky *in vivo*, poté *in vitro* experimentu s EGCG.

#### 4.1.1 Hmotnosti potkanů a jater

Všichni potkani přežili experiment až do konce, tj. do usmrcení. Jeden potkan ze skupiny EGCG50+PHx měl chirurgickou komplikaci (hemoperitoneum) a byl z dalších analýz vyřazen. Ve skupině I (AI+LAP) hmotnost potkanů po operaci vzrostla ( $p < 0,05$ ); u všech ostatních skupin jsme zaznamenali nesignifikantní pokles hmotnosti po operaci. Tělesné hmotnosti v době operace se mezi skupinami nelišily, nicméně tělesná hmotnost při usmrcení byla vyšší ve skupině AI+LAP oproti skupinám EGCG50+LAP a AI+PHx ( $p < 0,001$ ) (Obrázek 10).

**Tělesná hmotnost při operaci a při usmrcení**



Obrázek 10 – tělesné hmotnosti potkanů při operaci (den 1) a při usmrcení (den 2)

§  $p < 0,05$  při porovnání téže skupiny při operaci a při usmrcení

°°°  $p < 0,001$  při porovnání se skupinou AI+LAP v den usmrcení

V hepatektomovaných skupinách (III,IV,V) se jeví indexy jaterní regenerace nejvyšší ve skupině EGCG20+PHx, tedy s nižší dávkou EGCG; nejednalo se však o statisticky významné rozdíly (Tabulka 5).

Tabulka 5 – indexy jaterní regenerace

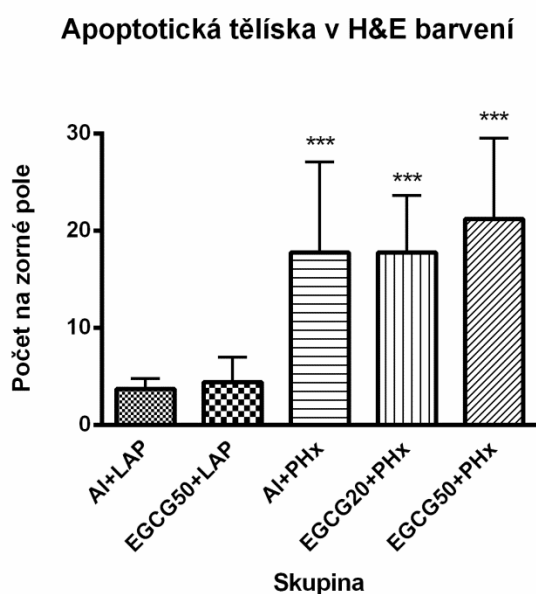
	AI + PHx	EGCG20+PHx	EGCG50+PHx
HRR (%)	9,5±4	13,5±6	8,9±10
LRR (%)	23,3±8	29,9±9	18,1±25

HRR (Murata et al., 2007), LRR (Selzner a Clavien, 2000)

#### 4.1.2 Histologické nálezy

Při barvení hematoxylinem-eosinem jsme pozorovali viditelnou akumulaci lipidů v hepatektomovaných skupinách (III,IV,V), což je známý jev již dříve popisovaný v literatuře (Murray et al., 1981). V periportálně lokalizovaných hepatocytech jsme navíc pozorovali vakuolizaci cytoplazmy a sporadický výskyt pyknotických jader. V centrálních částech jaterních lobulů jsme pozorovali ojedinělou přítomnost hepatocytů se zrnitou eosinofilní cytoplazmou. U žádného z potkanů jsme nepozorovali známky zánětlivé reakce.

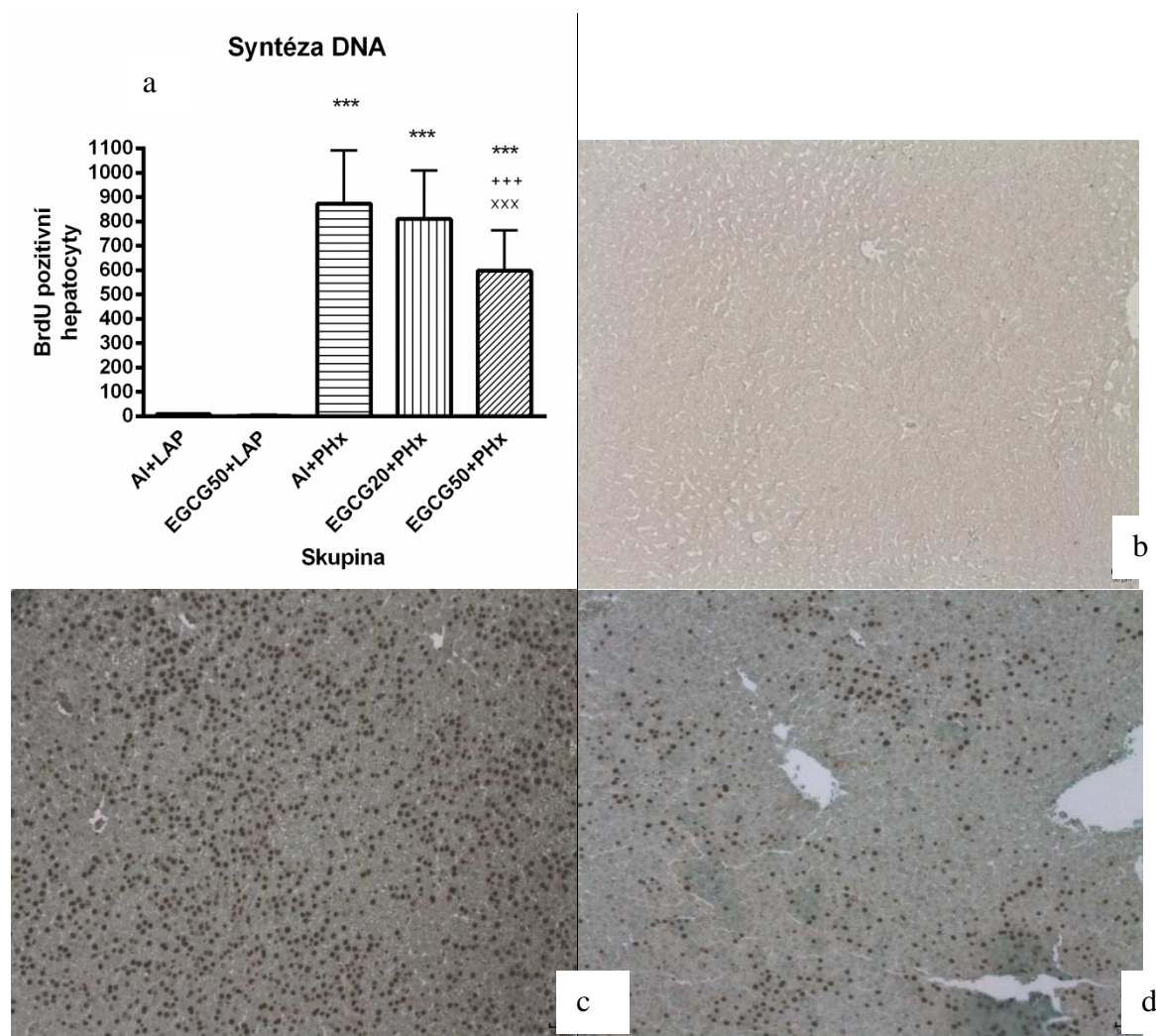
Počet apoptotických tělísek byl významně vyšší u hepatektomovaných zvířat (III,IV,V) než u laparotomovaných (I,II). Apoptotická tělíska byla zachycena zejména kolem centrálních žil. Laparotomované skupiny se mezi sebou v počtu apoptotických tělísek nelišily; stejně tak se od sebe nelišily hepatektomované skupiny (Obrázek 11).



Obrázek 11 – počet apoptotických tělísek v barvení hematoxylinem-eozinem

\*\*\*  $p < 0,001$  při porovnání s příslušnou laparotomovanou skupinou

Imonuhistochemické barvení na bromdeoxyuridin (BrdU) zachytilo jen ojedinělý výskyt pozitivních hepatocytů v laparotomovaných skupinách (I, II). U hepatektomovaných zvířat (III,IV,V) byla naopak pozitivita vysoká ( $p < 0,001$  oproti laparotomovaným kontrolám). Skupiny III a IV se od sebe významně nelišily. Naproti tomu počet BrdU pozitivních buněk ve skupině EGCG50+PHx byl statisticky významně nižší než ve skupinách AI+PHx a EGCG20+PHx ( $p < 0,001$  pro obě porovnání, Obrázek 12 a-d). BrdU pozitivita (poukazující na syntézu DNA) byla pozorována zejména v periportálních polích (Obrázek 12 c-d).



Obrázek 12 – inkorporace BrdU. **a** – graf porovnávající skupiny, \*\*\*  $p < 0,001$  oproti laparotomovaným kontrolám, +++  $p < 0,001$  oproti skupině AI+PHx, xxx  $p < 0,001$  oproti skupině EGCG20+PHx; **b** – ojedinělé BrdU pozitivní buňky u laparotomovaného potkana; **c** – četné BrdU pozitivní buňky u potkana ze skupiny III (AI+PHx); **d** – BrdU pozitivní buňky spíše jen v periportálních polích u potkana ze skupiny V (EGCG50+PHx).

#### 4.1.3 Biochemie séra

Glykémie byla vyšší ve skupině II (EGCG50+LAP) než ve skupině I (AI+LAP). Dále jsme pozorovali trend k vyšším hodnotám glykémie již při dávkách 20 mg/kg ve skupině IV (EGCG20+PHx) než ve skupině III (AI+PHx). Glykémie byly nižší v hepatektomovaných skupinách dostávajících EGCG než ve skupině EGCG50+LAP.

Aktivita alaninaminotransferázy a aspartátaminotransferázy byla vyšší u hepatektomovaných potkanů než u laparotomovaných, avšak statisticky významný rozdíl byl přítomný jen při srovnání skupin dostávajících EGCG, tj. EGCG20+PHx a EGCG50+PHx oproti EGCG50+LAP. Dále byl přítomen nesignifikantní trend k nižší aktivitě ALT a AST ve skupině EGCG20+PHx než ve skupině AI+PHx. Aktivita alkalické fosfatázy byla vyšší u všech hepatektomovaných skupin oproti laparotomovaným kontrolám.

Celkový bilirubin byl vyšší ve skupině EGCG50+LAP než ve skupině AI+LAP, dále u hepatektomovaných zvířat oproti laparotomovaným; významný rozdíl byl zjištěn pouze při porovnání skupiny AI+PHx se skupinou AI+LAP. Konjugovaný bilirubin byl rovněž vyšší u hepatektomovaných zvířat než u laparotomovaných, statistické významnosti dosáhl rozdíl jen při porovnání EGCG50+PHx oproti EGCG50+LAP. Jak celkový, tak konjugovaný bilirubin dosáhly nejvyšších hodnot ve skupině EGCG50+PHx; nejednalo se však o signifikantní rozdíl oproti ostatním hepatektomovaným skupinám (Tabulka 6).

Tabulka 6 – biochemie séra

	AI+LAP	EGCG 50 + LAP	AI + PHx	EGCG 20 + PHx	EGCG 50 + PHx
Glykémie (mmol/l)	7,01±0,61	10,49±0,28 <sup>o</sup>	7,97±0,57	8,9±0,69 *	8,71±0,75 *
ALT (μkat/l)	1,01±0,57	0,64±0,06	4,08±4,76	2,7±1,38 **	5,44±4,95 **
AST (μkat/l)	3,2±1,99	1,89±0,37	7,05±6,34	6,33±2,57 **)	9,92±8,20 **)
ALP (μkat/l)	2,4±0,45	2,57±0,32	7,08±1,11 ***	6,8±1,29 ***	6,61±1,39 ***
Bilirubin celkový (μmol/l)	2,0±0,0	3,0±0,0	4,0±1,55 *	3,5±0,55	5,6±2,19
Bilirubin konjug. (μmol/l)	1,83±0,41	2,0±0,0	2,6±0,89	2,17±0,41	4,2±2,28 *

<sup>o</sup> p<0,05 při porovnání skupiny EGCG50+LAP se skupinou AI+LAP

\*, \*\*, \*\*\* p<0,05; p<0,01; p<0,001 oproti laparotomovaným kontrolám

#### 4.1.4 Tkáňové cytokiny a markery oxidačního stresu

Pozorovali jsme nesignifikantní trend k poklesu TNF- $\alpha$  u hepatektomovaných zvířat léčených EGCG v porovnání se skupinou AI+PHx. Podobný trend byl zřejmý při měření cytokinu IL-6 a jeho koncentrace byla významně nižší ve skupině EGCG50+PHx než ve skupině AI+PHx ( $p<0,05$ ). Expres TGF- $\beta$ 1 se mezi skupinami nelišila.

Nesignifikantní trend k nižším hodnotám tkáňového malondialdehydu (MDA), oxidovaného a redukovaného glutationu, podobně jako plasmatického MDA byl viditelný při porovnání skupiny EGCG20+PHx se skupinami AI+PHx a EGCG50+PHx (Tabulka 7).

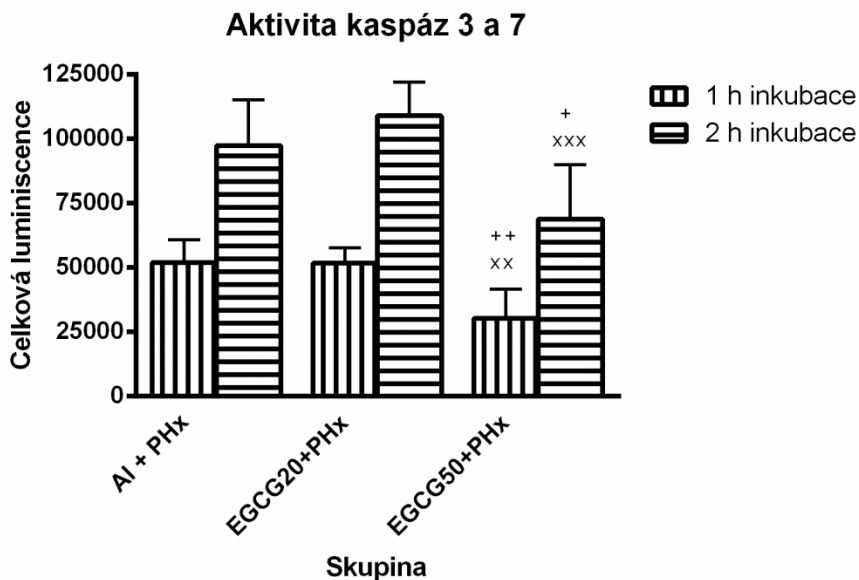
Tabulka 7 – cytokiny a markery oxidačního stresu

	AI + PHx	EGCG 20 + PHx	EGCG 50 + PHx
Plasmatický MDA ( $\mu$ mol/l)	1,20 $\pm$ 0,18	1,07 $\pm$ 0,18	1,24 $\pm$ 0,14
Tkáňový MDA (nmol/mg protein)	0,35 $\pm$ 0,20	0,27 $\pm$ 0,07	0,47 $\pm$ 0,13
Tkáňový GSH ( $\mu$ mol/l)	810 $\pm$ 195	717 $\pm$ 164	781 $\pm$ 144
Tkáňový GSSG ( $\mu$ mol/l)	238 $\pm$ 169	188 $\pm$ 140	241 $\pm$ 164
Tkáňový TNF- $\alpha$ (pg/ml)	803 $\pm$ 103	771 $\pm$ 69	752 $\pm$ 126
Tkáňový IL-6 (pg/ml)	785 $\pm$ 122	686 $\pm$ 111	660 $\pm$ 99 (+)
Tkáňový TGF- $\beta$ 1 (pg/ml)	8024 $\pm$ 4775	6340 $\pm$ 4053	7647 $\pm$ 4651

+  $p<0,05$  při porovnání skupiny EGCG50+PHx se skupinou AI+PHx

#### 4.1.5 Aktivita kaspáz *in vivo*

Po inkubaci s Caspase Glo Reagent byla aktivita kaspáz 3 a 7 nižší ve skupině EGCG50+PHx než ve skupinách AI+PHx a EGCG20+PHx ( $p < 0,01$  pro obě porovnání). Stejných výsledků jsme dosáhli při prodloužení expozice na dobu 2 hodiny (Obrázek 13).



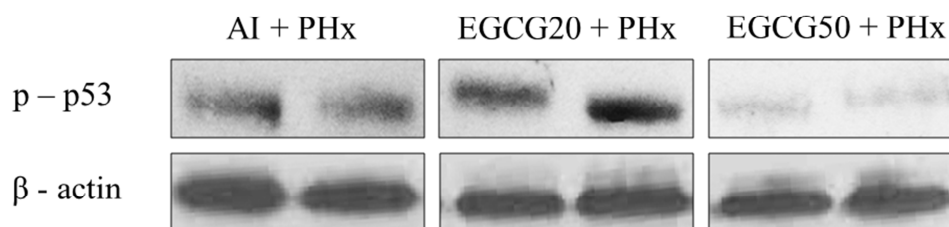
Obrázek 13 – aktivita kaspáz 3 a 7

+  $p < 0,05$ , ++  $p < 0,01$  oproti skupině AI+PHx

xx  $p < 0,01$ , xxx  $p < 0,001$  oproti skupině EGCG20+PHx

#### 4.1.6 Exprese bílkovin regulujících buněčný cyklus

Expresi proteinů p21 a p-p27 se mezi hepatektomovanými skupinami nelišila. Rozdíl byl pozorován v expresi fosforylovaného proteinu p53 – jevila se vyšší ve skupině IV (EGCG20+PHx) a nižší ve skupině V (EGCG50+PHx) oproti skupině III (AI+PHx) (Obrázek 14). Protein Bcl-2 se nám nepodařilo zachytit, byl pod mez detekce metody.



Obrázek 14 – Western Blot fosforylovaného proteinu p53 s beta aktinem jako kontrolním proteinem.



#### **4.1.7 Genová exprese Hmox1 a Nqo1 *in vivo***

Nepodařilo se prokázat rozdíl v expresi mRNA genů pro Nqo-1 a HO-1 mezi hepatektomovanými skupinami, částečně i vzhledem k malému vzorku použitých do této analýzy (n=3). Pozorovali jsme jen nesignifikantní trend k nižší expresi HO-1 ve skupině EGCG20+PHx a vyšší ve skupině EGCG50+PHx při porovnání se skupinou AI+PHx.

#### **4.1.8 Buněčná viabilita a funkční parametry hepatocytů *in vitro***

Jak vyplývá z testů WST-1, LDH leakage a syntézy albuminu, vykazoval EGCG u obou skupin, tj. hepatocytů izolovaných z potkanů po LAP i PHx, toxický účinek od koncentrace 10  $\mu\text{mol/l}$  po 24hodinové inkubaci. Zajímavým zjištěním byla nižší LDH leakage u hepatocytů izolovaných z potkanů po PHx při koncentracích EGCG 10  $\mu\text{mol/l}$  a 15  $\mu\text{mol/l}$  ve srovnání s hepatocyty po LAP. Podobně podle syntézy albuminu byla funkce buněk při těchto koncentracích EGCG zachovalejší u buněk z potkanů po PHx než u potkanů po LAP, byť se jednalo o nesignifikantní rozdíl.

EGCG o koncentraci 1  $\mu\text{mol/l}$  vykazoval, alespoň podle testu WST-1 a syntézy albuminu, trend k vyšší viabilitě oproti hepatocytům vystaveným samotnému médiu. Koncentrace EGCG 5  $\mu\text{mol/l}$  byla shledána bezpečnou (Tabulka 8).

Při delší expozici (48 až 72 hodin) byla toxicita naznačena rovněž při expozici EGCG o koncentraci 5  $\mu\text{mol/l}$ .

#### **4.1.9 Markery oxidačního stresu *in vitro***

Produkce ROS měřená metodou DCFDA byla vyšší u hepatocytů z potkanů po LAP, zejména u kontrol a buněk exponovaných 1  $\mu\text{M}$  EGCG. Při vyšších koncentracích byla produkce ROS podobná u hepatocytů z obou skupin potkanů.

Zajímavé je, že opačný trend byl viditelný u lipoperoxidace: vyšší hladiny MDA byly naměřeny u hepatocytů z potkanů po PHx než u těch po LAP. Lipoperoxidace byla vyšší u hepatocytů exponovaných vysokým dávkám EGCG (Tabulka 8).

#### **4.1.10 Syntéza DNA *in vitro***

Zde jsme pozorovali trend k vyšší syntéze DNA u hepatocytů izolovaných z potkanů po PHx ve srovnání s potkany po LAP, jak je patrné z inkorporace BrdU. EGCG vedl ke snížení syntézy DNA. Při koncentracích  $\mu\text{mol/l}$  a vyšší byla inkorporace BrdU dokonce nižší než background kontrola (Tabulka 8).

Tabulka 8 – porovnání vlivu EGCG na hepatocyty izolované z potkanů po PHx a LAP *in vitro*

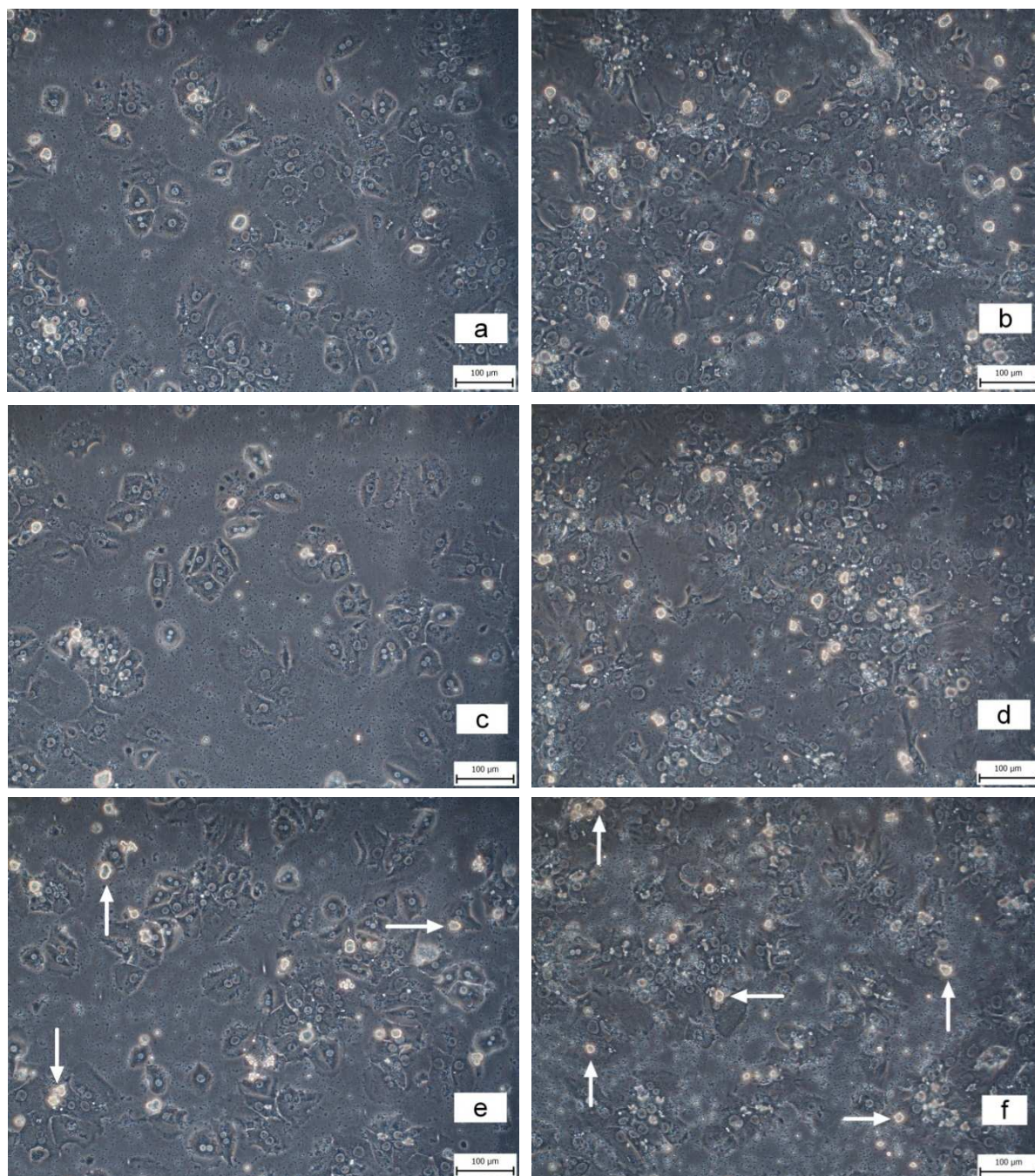
	LAP + EGCG (μmol/l)					PHx + EGCG (μmol/l)				
	0	1	5	10	15	0	1	5	10	15
WST-1 (n=8)	100,0±13,2	120,5±25,6 *	81,7±14,1	54,1±8,7 ***	44,7±4,8 ***	79,5±8,4 ‡	85,9±8,5 ‡‡‡	75,7±9,2	53,0±4,7 ††	40,4±2,0 †††
LDH leakage (n=6)	10,6±0,3	10,4±0,6	13,5±0,7	25,3±1,6 ***	25,3±2,0 ***	12,1±1,4	12,0±1,1	12,6±1,4	16,9±2,6 †††,‡‡‡	16,7±2,4 †††,‡‡‡
Albumin (n=6)	7,01±0,62	7,26±0,33	5,18±0,45	2,37±0,18	1,95±0,07 *	7,60±0,73	8,10±0,26	7,94±0,52	3,92±0,24	3,40±0,84
ROS (n=8)	100±2	80±3 ***	96±4 ***	71±8 ***	58±3 ***	48±2 ‡‡‡	42±1 ‡‡‡	52±3 ‡‡‡	71±3 †††	65±3 †††,‡
MDA (n=6)	0,33±0,08	0,28±0,03	0,29±0,06	0,32±0,02	0,36±0,05	0,38±0,04	0,37±0,04	0,46±0,06 ‡‡‡	0,50±0,08 ††,‡‡‡	0,41±0,05
Syntéza DNA (n=6)	95,5±9,0	83,8±9,8	66,6±3,7	20,6±2,7	14,3±2,9 *	126,8±9,9	126,3±4,1	95,1±5,2	62,0±1,9 †	34,3±1,6 ††

WST-1 test (% LAP kontrol), LDH leakage (%), hladina albuminu v médiu (μg/ml), produkce ROS (% LAP kontrol), hladina malondialdehydu (MDA) v médiu (μmol/l), syntéza DNA (% background kontroly).

\*,\*\*\* p<0,05; 0,001 vs. kontrolní LAP; †,††,††† p<0,05, 0,01, 0,001 vs.kontrolní PHx; ‡,‡‡,‡‡‡ p<0,05; 0,001 vs.LAP o stejné koncentraci EGCG

#### 4.1.11 Morfologie buněk *in vitro*

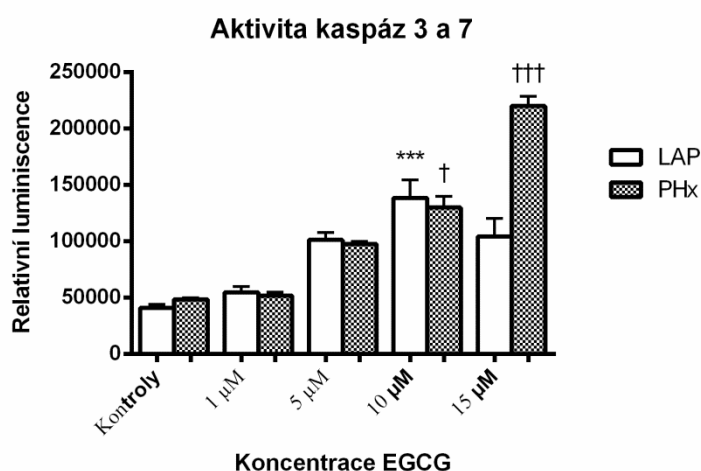
V mikrofotografiích jsme pozorovali následující známky buněčného poškození: vysoké množství mezibuněčného detritu, uvolnění buněk z kolagenu, zrnitost cytoplazmy, kulovitý tvar buněk a ztrátu viditelnosti buněčného jádra, to v části buněk u hepatocytů z obou skupin při expozici EGCG o koncentracích 10  $\mu\text{mol/l}$  a vyšších (Obrázek 15a-f).



Obrázek 15 – mikrofotografie hepatocytů z potkanů po LAP (a,c,e) resp. PHx (b,d,f) po 24hodinové inkubaci: **a, b** – kontrolní hepatocyty; **c, d** – hepatocyty vystavené 1  $\mu\text{M}$  EGCG; **e, f** – hepatocyty vystavené 15  $\mu\text{M}$  EGCG. Šipky ukazují hepatocyty uvolněné z kolagenu. Měřítka vyznačují 100  $\mu\text{m}$ .

#### 4.1.12 Aktivita kaspáz *in vitro*

EGCG vedl k nárůstu aktivity kaspáz 3 a 7 při koncentraci 10  $\mu\text{mol/l}$  a vyšší u hepatocytů izolovaných z potkanů po PHx a pouze při koncentraci 10  $\mu\text{mol/l}$  u hepatocytů po LAP. Nejvyšší aktivita byla naměřena u hepatocytů z potkanů po PHx exponovaných 15  $\mu\text{M}$  EGCG; nepodařilo se však prokázat statisticky významný rozdíl oproti hepatocytům z potkanů po LAP exponovaným téže koncentraci EGCG (Obrázek 16).

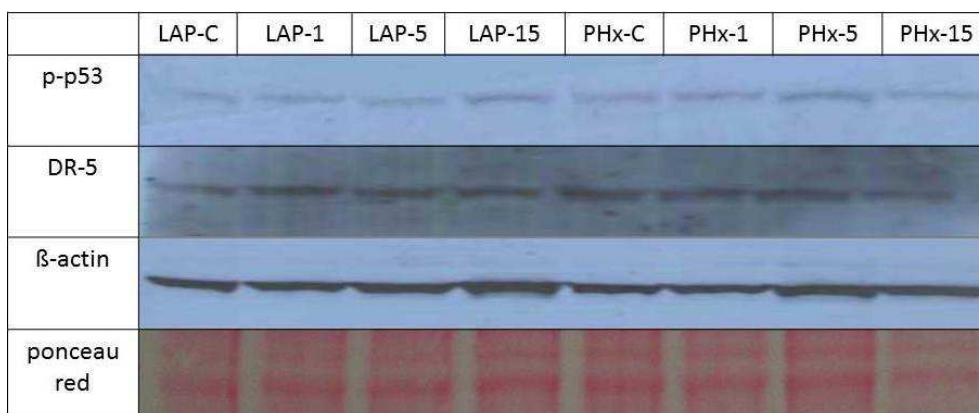


Obrázek 16 – aktivita kaspáz 3 a 7 po 24hodinové inkubaci.

\*\*\*  $p < 0,001$  proti kontrolní LAP; †, †††  $p < 0,05$ ; 0,001 proti kontrolní PHx

#### 4.1.13 Exprese proteinů *in vitro*

Protein Bcl-2 jsme nebyli schopni detekovat. Exprese proteinů DR5 a fosforylovaného p53 se mezi skupinami nelišily (Obrázek 17).



Obrázek 17 – Western Blot proteinů phospho-p53 a DR5. LAP-C a PHx-C značí kontrolní hepatocyty z potkanů po LAP resp. PHx, čísla značí koncentrace EGCG v  $\mu\text{mol/l}$ .

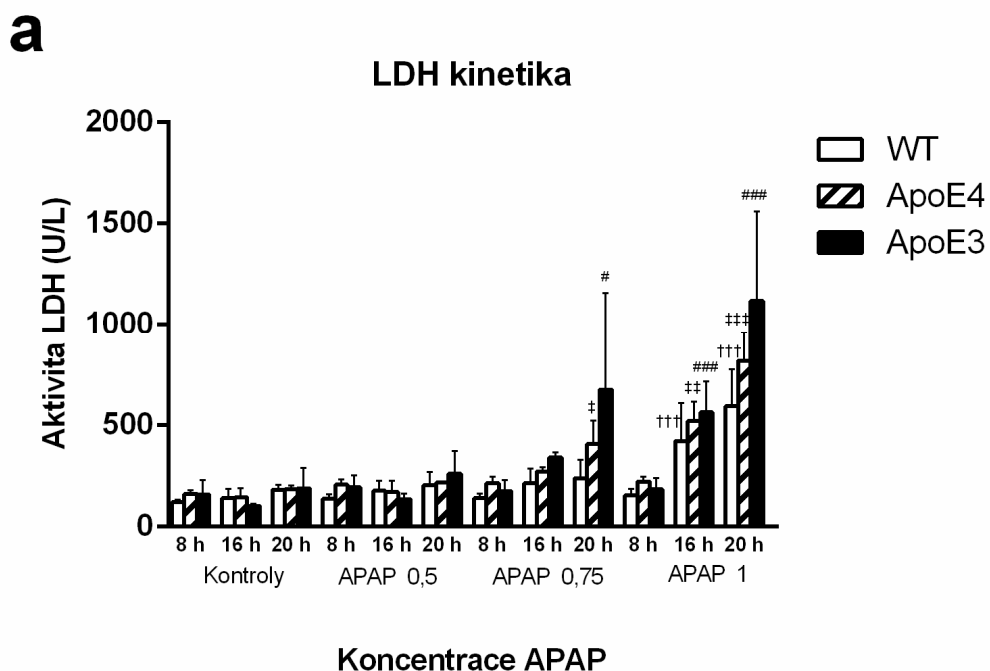
## 4.2 Část druhá: vliv genotypu apolipoproteinu E na hepatotoxicitu

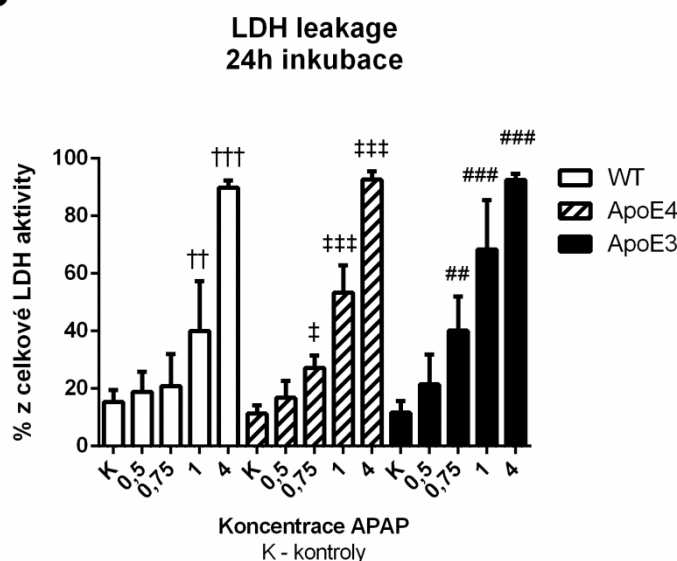
Jak bylo popsáno v metodice, ve druhé části práce jsme se zabývali vlivem genotypu apolipoproteinu E na hepatotoxicitu acetaminofenu (APAP) u transgenních myší. Na rozdíl od první části a především z důvodu mimořádné finanční náročnosti jsme zde provedli pouze *in vitro* experimenty.

### 4.2.1 Buněčná viabilita

Jak je patrné z aktivity extracelulární laktátdehydrogenázy (LDH), APAP vedl k toxicitě, která byla závislá na dávce a na délce expozice. Po 16hodinové inkubaci s 1 mM APAP jsme pozorovali signifikantní nárůst aktivity LDH v médiu u všech testovaných kmenů. Po 20 h byl vzestup nejnápadnější u hepatocytů ApoE3 (Obrázek 18a).

Poškození po 24 hodinách expozice 0,75 mmol/l a 1 mmol/l APAP podle LDH leakage bylo nejzávažnější u hepatocytů z ApoE3 myší; rozdíl mezi genotypy nedosáhl statistické významnosti. Při expozici 4 mmol/l APAP dosáhl LDH leakage 90% a byl podobný ve všech skupinách, což poukazuje na nekrózu většiny buněk (Obrázek 18b).



**b**

Obrázek 18 – a) kinetika extracelulární laktátdehydrogenázy (LDH), n=3-6.

b) LDH leakage. †,††,††† vs WT kontroly; ‡,‡‡,‡‡‡ vs ApoE4 kontroly; #,##,### vs ApoE3 kontroly; p<0,05; 0,01; 0,001 resp.

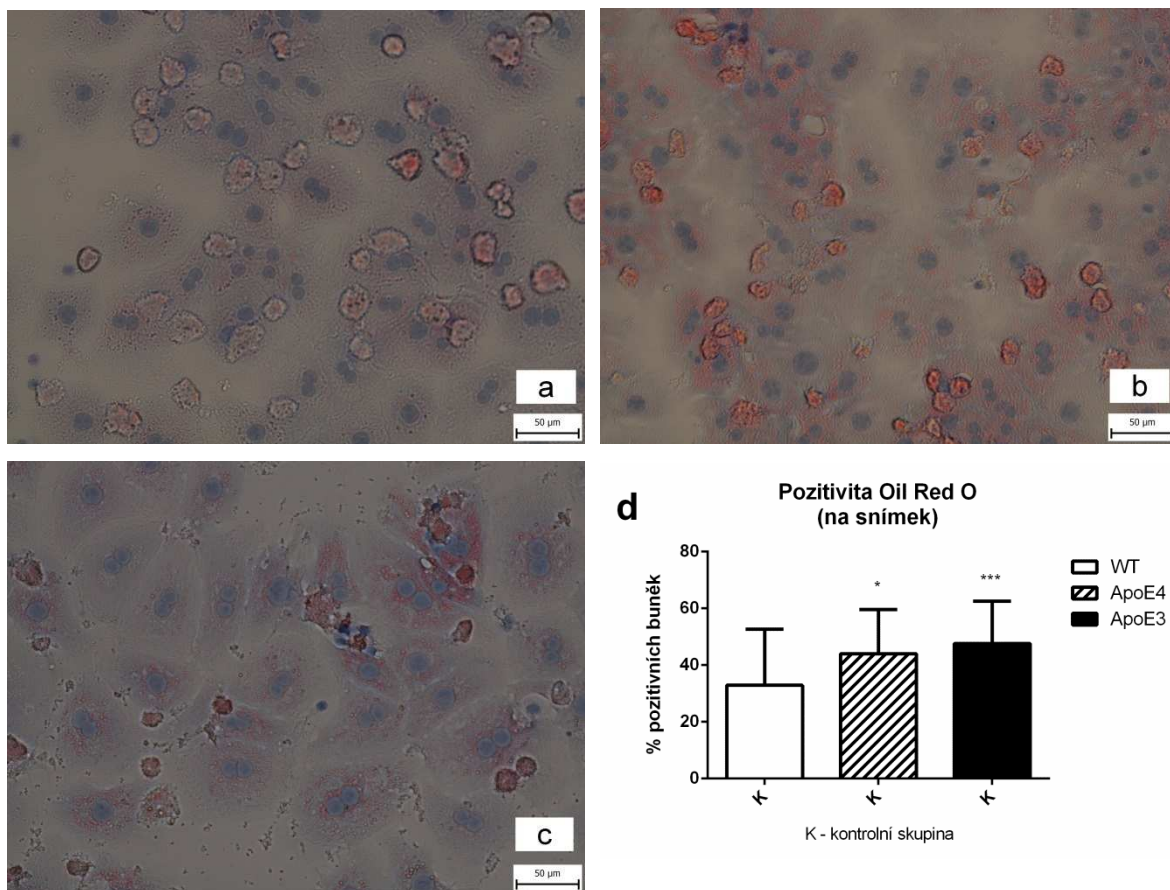
V případě WST-1 testu byla aktivita buněčných dehydrogenáz významně nižší u hepatocytů vystavených 4 mmol/l APAP po dobu 24 h oproti kontrolám ve všech skupinách (p<0,001). Tento pokles byl více vyjádřen u obou transgenních kmenů, zejména u ApoE3 hepatocytů (Tabulka 9).

#### 4.2.2 Mikroskopické hodnocení

Inkubace hepatocytů všech genotypů s 1 mmol/l APAP po dobu 24 hodin vedla ke známám poškození při pozorování ve fázovém kontrastu: uvolnění buněk z kolagenu, kulovitý tvar buněk, membránový „blebbing“, zvýšená zrnitost cytoplazmy a ztráta viditelnosti jádra. Ztráta viditelnosti jádra byla nejvíce vyjádřena u hepatocytů z ApoE3 myší. Dále jsme si povšimli nápadných nitrobuněčných vakuol připomínajících tukové kapénky u obou transgenních kmenů.

Procento buněk pozitivních při barvení olejovou červení bylo vyšší u kontrolních hepatocytů z ApoE4 a ApoE3 myší než u kontrolních wild-type hepatocytů po 24hodinové kultivaci (p<0,05 pro ApoE4 a p<0,001 pro ApoE3). Transgenní kmeny se v pozitivitě významně nelišily (Obrázek 19a-d).





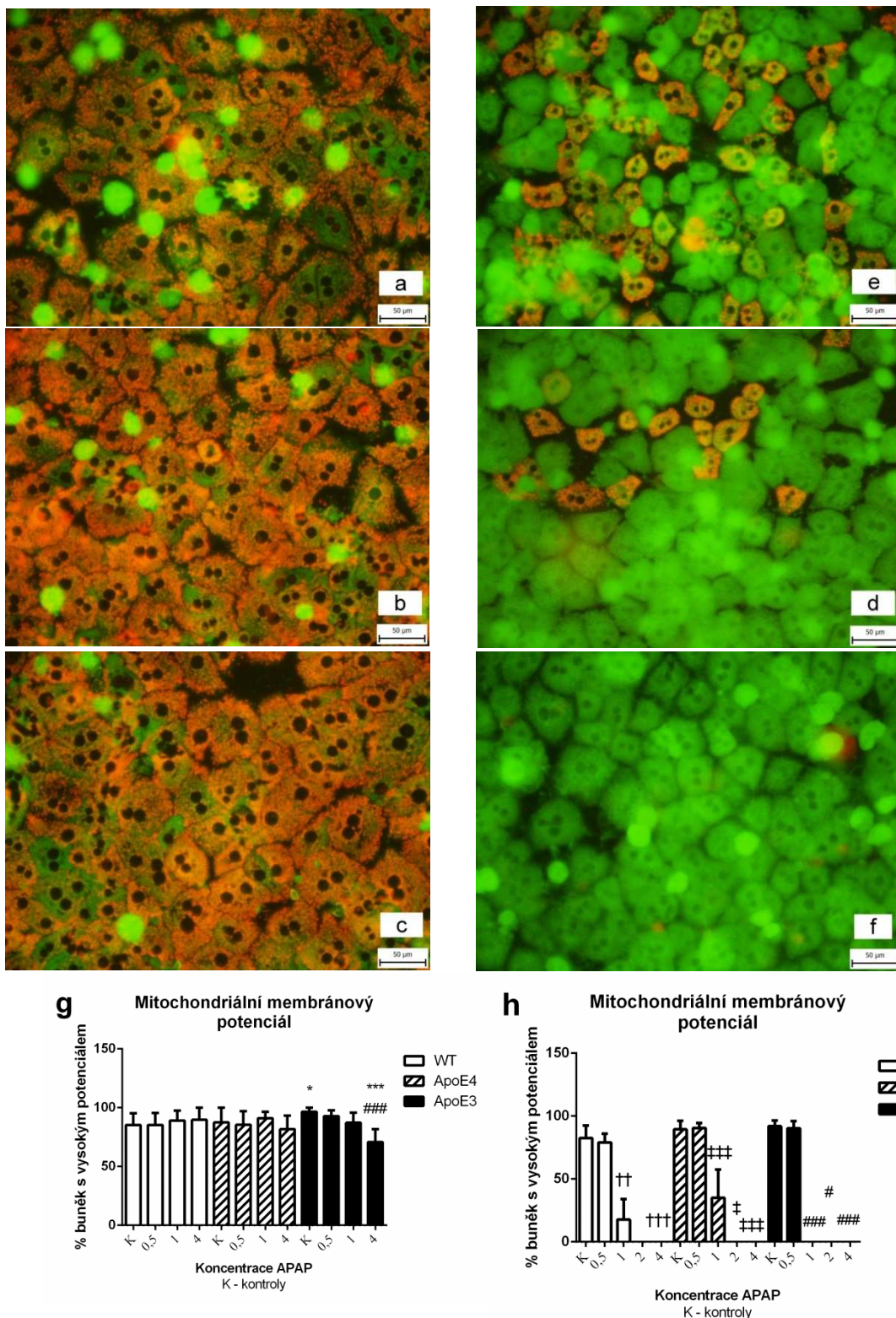
Obrázek 19 – barvení olejovou červení s hematoxylinem jako jaderným barvením; 24hodinová kultivace bez APAP. Typická zorná pole pro a) WT, b) ApoE4, c) ApoE3 hepatocyty. d) Procento pozitivních buněk; \*,\*\*\*  $p < 0,05$ ;  $0,001$  vs. odpovídající WT kontroly. Zvětšení objektivu 40x, měřítko značí 50  $\mu\text{m}$ .

#### 4.2.3 Mitochondriální membránový potenciál (MMP)

Po 4 hodinách byl počet buněk s vysokým mitochondriálním membránovým potenciálem významně nižší u buněk z ApoE3 myši vystavených 4 mmol/l APAP ve srovnání s ApoE3 kontrolami a s odpovídajícími WT hepatocyty ( $p < 0,001$  pro obě srovnání). Potenciál byl vyšší u kontrolních buněk z ApoE3 myši než u WT buněk ( $p < 0,05$ ) (Obrázek 20g).

Po 24 hodinách byl významný pokles v MMP v případě buněk vystavených koncentraci APAP 1 mmol/l a vyšší u všech genotypů ( $p < 0,01$ ). MMP byl prakticky vymizelý v hepatocytech z ApoE3 myši vystavených 1 mmol/l APAP po dobu 24 hodin; u hepatocytů z WT a ApoE4 myši byl pokles MMP patrný až při expozici 2 mmol/l APAP. Koncentrace 0,5 mmol/l APAP neměla na MMP žádný vliv (Obrázek 20h).





Obrázek 20 – Hepatocyty z WT (a,d), ApoE4 (b,e) a ApoE3 myši (c,f) po 24hodinové kultivaci. **a, b, c** – kontroly; **d, e, f** – hepatocyty vystavené 1 mmol/l APAP. Oranžové buňky - vysoký membránový potenciál, zelené buňky - nízkým potenciál. Procento buněk s vysokým potenciálem **g)** po 4hodinové a **h)** po 24hodinové inkubaci; †,††,††† vs kontrolní WT; ‡,‡‡,‡‡‡ vs kontrolní ApoE4; #,##,### vs kontrolní ApoE3; \*,\*\*,\*\*\* vs odpovídající WT;  $p < 0,05$ , 0,01, 0,001 resp. Zvětšení objektivu 40x, měřítko značí 50  $\mu\text{m}$ .

#### 4.2.4 Markery oxidačního stresu

Produkce ROS hodnocená metodou DCFDA vykazovala nesignifikantní vzestup při expozici 2,5 mmol/l APAP v případě hepatocytů z WT myší a signifikantní vzestup u obou transgenních kmenů ( $p < 0,01$  pro ApoE4 a  $p < 0,001$  pro ApoE3) po 24hodinové kultivaci (Tabulka 9).

Hladiny MDA v kultivačním médiu se mezi skupinami nelišily a nebyly významně ovlivněny expozicí APAP. Byl viditelný pouze nesignifikantní trend k vyšší produkci MDA při koncentraci 1 mmol/l a 4 mmol/l APAP oproti kontrolám u všech genotypů (Tabulka 9).

#### 4.2.5 Metabolismus glutathionu

Na dávce závislý pokles hladiny redukovaného glutathionu (GSH) byl pozorován ve všech buňkách vystavených působení APAP. Při nejvyšší koncentraci APAP, tj. 4 mmol/l, byly koncentrace GSH pod detekční mezí v případě obou transgenních kmenů. Po 24hodinové kultivaci s 1 mmol/l APAP byly koncentrace GSH nejnižší v hepatocytech z ApoE3 myší, mezi genotypy však nebyl prokázán signifikantní rozdíl (Tabulka 9).

Koncentrace konjugátu APAP s glutathionem (APAP-SG) po 4 hodinové kultivaci byly pod detekční mezí v buňkách vystavených koncentraci APAP 1 mmol/l a nižší. Při koncentraci 4 mmol/l APAP byly koncentrace APAP-SG vyšší v obou transgenních kmenech než ve wild-type hepatocytech ( $p < 0,01$  pro ApoE4, nesignifikantní pro ApoE3). Nebyl prokazatelný významný rozdíl mezi transgenními kmeny (Tabulka 9).

#### 4.2.6 Aktivita kaspáz

Aktivita exekutivních kaspáz 3 a 7 se mezi skupinami nelišila ve 4hodinovém intervalu. Při působení 4 mmol/l APAP po dobu 24 hodin byl viditelný nápadný pokles aktivit u všech genotypů, nejvíce v případě genotypu ApoE3 (Tabulka 9). Podobné výsledky byly zaznamenány i v případě vyjádření hodnot jako relativní luminiscence na  $\mu\text{g}$  proteinu.

Tabulka 9 – porovnání toxicity acetaminofenu vůči hepatocytům z myší WT, ApoE4 a ApoE3 *in vitro*

	WT + APAP (mmol/l)				ApoE4 + APAP (mmol/l)				ApoE3 + APAP (mmol/l)			
	0	0,5	1	4	0	0,5	1	4	0	0,5	1	4
WST-1 (n=6)	100,0±8,9	108,8±11,3	n/a	30,6±12,8 †††	100,0±13,1	92,6±11,6	91,1±16,6	15,2±8,6 ‡‡‡	100,0±12,2	91,5±18,0	80,7±14,0	9,2±3,8 ###
Kaspázy (n=4)	64,9±13,7	61,7±13,8	n/a	6,2±4,2	93,9±6,7	88,2±8,7	74,5±3,9	4,6±3,3 ‡‡‡	97,2±12,3	84,3±13,9	64,7±10,4	3,3±2,0 ###
MDA (n=4)	1,22±0,10	1,19±0,10	1,58±0,15	1,62±0,08	1,26±0,15	1,35±0,32	1,63±0,13	1,63±0,15	1,25±0,09	1,50±0,34	1,70±0,17	1,75±0,12
GSH (n=4)	29,3±1,4	21,4±1,7	7,4±1,7	4,2±0,0	36,4±2,4	30,5±1,0	8,1±5,0 ‡	ND	41,3±4,8	26,3±1,8	3,9±0,1	ND
APAP-SG (n=4)	ND	ND	ND	4,3±0,4	ND	ND	ND	12,1±0,8 **	ND	ND	ND	10,3±0,6
	WT + APAP (mmol/l)				ApoE4 + APAP (mmol/l)				ApoE3 + APAP (mmol/l)			
	0	0,5	1	2,5	0	0,5	1	2,5	0	0,5	1	2,5
ROS (n=8)	100±36	117±33	109±32	205±57	100±9	113±10	172±35 *	1409±73 ‡‡	100±13	96±15	356±70 #	1892±140 ###

WST-1 test (% příslušných kontrol), aktivita kaspáz (relativní luminiscence), hladina malondialdehydu (MDA) v médiu (μmol/l), GSH v buněčném lyzátu (μmol/l), APAP-SG v buněčném lyzátu (μmol/l), produkce ROS (% příslušných kontrol). Hladina APAP-SG byla měřena ve 4hodinovém intervalu; všechny ostatní hodnoty reprezentují 24hodinový interval.

†,††,††† vs kontrolní WT; ‡,‡‡,‡‡‡ vs kontrolní ApoE4; #,##,### vs kontrolní ApoE3;

\*,\*\*,\*\*\* vs odpovídající WT; p<0,05; 0,01; 0,001 resp.

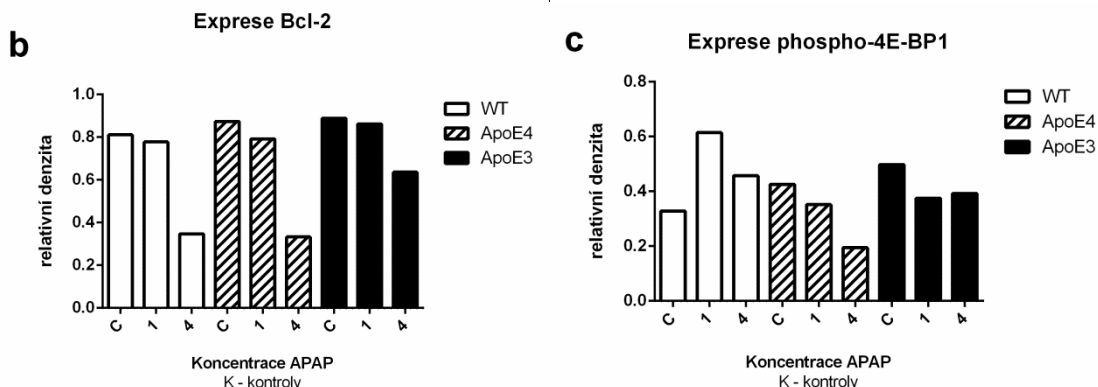
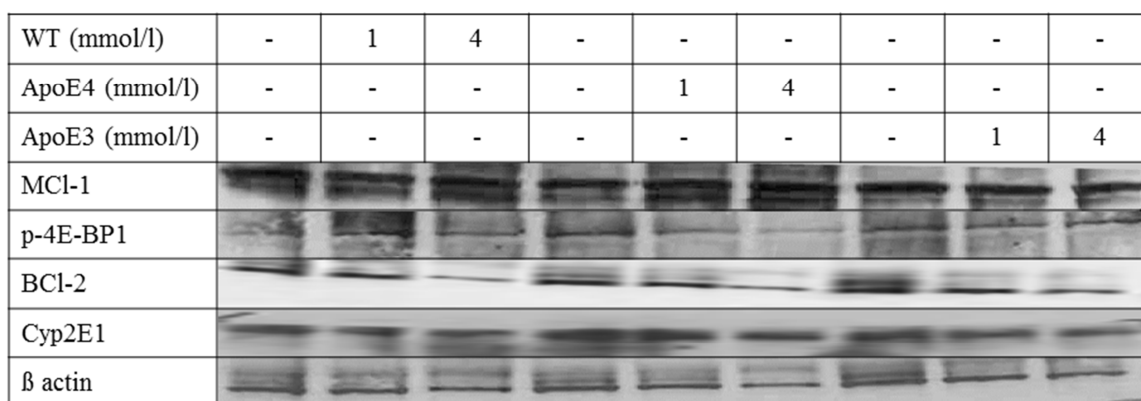
n/a = nebylo měřeno, ND = pod mez detekce.

#### 4.2.7 Expres proteinů

Expres antiapoptotického proteinu Bcl-2 byla down-regulována u hepatocytů vystavených 4 mmol/l APAP po dobu 4 hodin. Tento pokles byl více vyjádřen u hepatocytů z WT a ApoE4 myši než u těch z ApoE3 myši (Obrázek 21b). Naproti tomu žádné výrazné změny jsme nepozorovali v případě dalšího antiapoptotického proteinu, Mcl-1 (Obrázek 21a).

Expres fosforylovaného 4E-BP1 vykazovala vzestup po 4 hodinách kultivace s 1 a 4 mmol/l APAP v případě wild-type hepatocytů. U ApoE4 buněk byl naopak pozorován pokles phospho-4E-BP1, zejména v buňkách vystavených 4 mmol/l APAP. Jenom mírný pokles tohoto proteinu po vystavení 1 a 4 mmol/l APAP byl pozorován v ApoE3 hepatocytech (Obrázek 21c).

Hladiny izoformy 2E1 cytochromu P450 vykazovaly mírný pokles při expozici 4 mmol/l APAP u všech testovaných genotypů (Obrázek 21a).



Obrázek 21 – Proteinová exprese. **a)** Western blot po 4hodinové kultivaci. Denzitometrická analýza proteinu **b)** Bcl-2, **c)** fosforylovaného 4E-BP1.

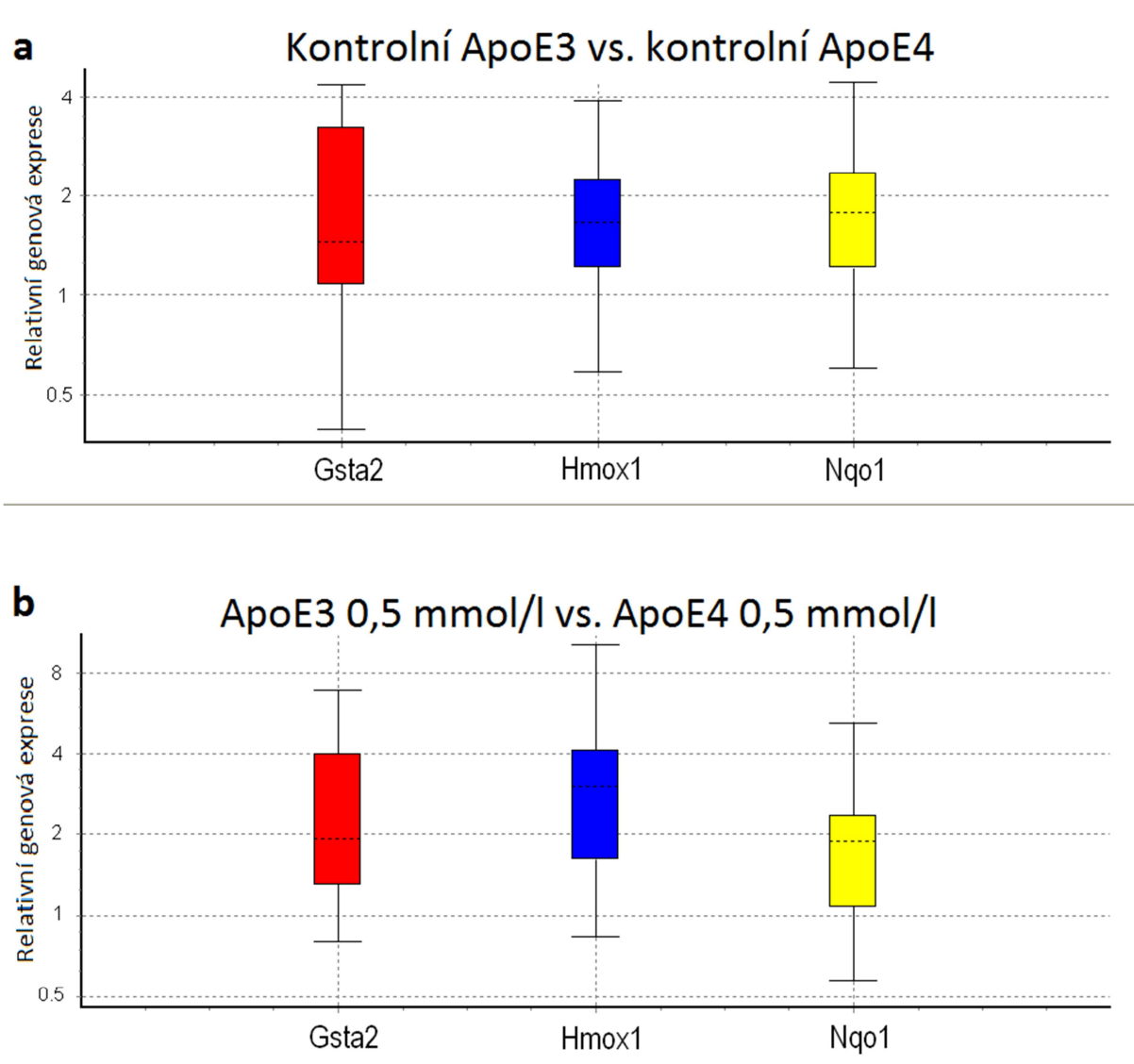
#### 4.2.8 Genová exprese

V suspenzi hepatocytů byla nižší exprese genu *Gsta2* a vyšší exprese *Hmox1* v hepatocytech z ApoE4 myši oproti wild-type hepatocytům ( $p < 0,05$ ). Podobný, ale nesignifikantní trend byl viditelný při srovnání ApoE3 vs. WT. Neprokázali jsme významné rozdíly v expresi sledovaných genů mezi transgenními kmeny v suspenzi hepatocytů.

U hepatocytů v kultuře byl po 24 hodinách výtěžek RNA dostatečný pro další analýzy pouze v případě buněk kontrolních (vystavených samotnému médiu) a buněk vystavených 0,5 mmol/l APAP; nebyli jsme schopni analyzovat RNA z buněk vystavených 1 mmol/l APAP a vyšší koncentraci. Exprese genů *Gsta2* a *Nqo1* byla nižší u kontrolních ApoE4 hepatocytů než u kontrolních WT hepatocytů ( $p < 0,001$ ). Exprese *Gsta2* byla rovněž nižší v kontrolních ApoE3 hepatocytech než v kontrolních WT hepatocytech ( $p < 0,05$ ). Všechny tři sledované geny vykazovaly vyšší expresi v kontrolních ApoE3 hepatocytech než v kontrolních ApoE4 hepatocytech:  $p < 0,05$  pro *Gsta2* a  $p < 0,01$  pro *Nqo1* a *Hmox1* (Obrázek 22a).

V buňkách vystavených 0,5 mmol/l APAP po dobu 24 hodin byla nižší exprese *Gsta2* ( $p < 0,001$ ) a *Nqo1* ( $p < 0,05$ ) při srovnávání ApoE4 a WT hepatocytů. Exprese *Gsta2* byla nižší ( $p < 0,05$ ) a *Hmox1* vyšší ( $p < 0,01$ ) při srovnání ApoE3 a WT hepatocytů. Rovněž zde vykazovaly všechny tři sledované geny vyšší expresi v ApoE3 než v ApoE4 hepatocytech:  $p < 0,01$  pro *Gsta2* a *Nqo1*,  $p < 0,001$  pro *Hmox1* (Obrázek 22b).

Při srovnání kontrolních buněk s buňkami vystavenými 0,5 mmol/l APAP byl pozorovatelný nárůst exprese *Gsta2* a/nebo *Hmox1* u všech testovaných genotypů: upregulace *Gsta2* u WT hepatocytů ( $p < 0,05$ ), *Hmox1* u ApoE4 hepatocytů ( $p < 0,01$ ), a konečně *Gsta2* a *Hmox1* u ApoE3 hepatocytů ( $p < 0,001$ ).



Obrázek 22 – Kvantitativní real-time PCR srovnávající expresi genů u ApoE3 a ApoE4 hepatocytů po 24 hodinové kultivaci (krabičkové grafy): **d)** kontrolní hepatocyty, **e)** hepatocyty vystavené 0,5 mmol/l APAP.

## 5. Diskuze

### 5.1 Část první: vliv epigalokatechingalátu na játra

Navzdory celé řadě studií popisujících prospěšný vliv EGCG na játra v mnoha experimentálních modelech, v našem experimentu nebyl průkazný žádný přínos pro regeneraci jater po parciální hepatektomii. Dokonce jsme zaznamenali nižší syntézu DNA u potkanů dostávajících vyšší dávku EGCG. Na základě našich výsledků nemůže být doporučeno podávání EGCG v situacích změněné funkce orgánu, jako během regenerace jater.

Naše výsledky jsou v rozporu s týmem autorů Saito et al. (2014), kteří popsali stimulační účinek extraktu ze zeleného čaje na regeneraci jater po 90% parciální hepatektomii. Překvapivě v ovlivněných skupinách zároveň zjistili nižší exprese genů pro TNF- $\alpha$  a NF- $\kappa$ B, které jsou pro regeneraci jater po PHx potřebné (Michalopoulos, 2007) a NF- $\kappa$ B je navíc důležitý pro přežití buněk v zátěžových situacích (Wullaert et al., 2006). Rozdílné výsledky mohou být dané jiným modelem (70% vs 90% parciální hepatektomie), jakož i cestou podání – Saito et al. (2014) podávali po dobu sedmi dnů vodu s 0,5% extraktem obsahující i další příměsi. Vzhledem k nízké biodostupnosti EGCG u potkanů po enterálním podání (Chen et al., 1997) lze očekávat, že plazmatické koncentrace dosažené v našem experimentu byly přibližně o dva řády vyšší. Přínos extraktu shledali Saito et al. (2014) v prvních dnech po PHx, ale nikoliv v pozdějších fázích regenerace. Toto je limitem naší studie, neboť jsme sledovali pouze 24hodinový interval.

Účinek EGCG je komplexní: pomocí studie s mikročipy (microarrays) bylo identifikováno několik set genů, jejichž exprese je právě působením EGCG ovlivněna (Shen et al., 2005). Dále jsou známy protinádorové účinky EGCG, jakož i jeho schopnost inhibovat buněčnou proliferaci (Singh et al., 2011, Yang a Wang, 2010).

EGCG byl v některých pracích schopen snižovat produkci TNF- $\alpha$  (Yang et al., 1998) a IL-6 (Singh et al., 2011). Tyto cytokiny hrají zásadní roli v regeneraci jater (Yamada et al., 1997, Michalopoulos, 2010). Proto nás zajímalo, jestli byl inhibiční účinek EGCG na syntézu DNA zprostředkován touto cestou. Pozorovali jsme pouze nesignifikanční trend k nižším hladinám TNF- $\alpha$  u hepatektomovaných potkanů dostávajících EGCG oproti hepatektomovaným kontrolám. Možným odůvodněním je fakt, že TNF- $\alpha$  se účastní spíše v časných fázích regenerace jater (Michalopoulos, 2007). Hladiny IL-6 byly již významně nižší ve skupině EGCG50+PHx oproti skupině AI+PHx.

Některými autory byla popsána schopnost EGCG aktivovat kaspázy a zvýšit apoptózu (Smith et al., 2002, Roy et al., 2005, Shankar et al., 2007, Gupta et al., 2003). K našemu překvapení jsme našli naopak nižší aktivitu kaspáz 3 a 7 v jaterním homogenátu z jater skupiny EGCG50+PHx než u homogenátů z jater potkanů AI+PHx. Možným vysvětlením může být rozdílný účinek EGCG na nádorové a normální buňky: EGCG byl schopen snížit apoptózu v hepatocytech vystavených toxickému poškození (Kagaya et al., 2002, Wang et al., 2006). Popsáno bylo i přímé snížení aktivity kaspázy 3 působením EGCG (Katunuma et al., 2004). Nebyli jsme schopni detekovat protein Bcl-2 pomocí metody Western blot. Nejsme však prvním pracovištěm, kterému se toto nezdařilo – Tzung et al. (1997) popisovali hladiny Bcl-2 na úrovni mRNA i proteinu pod mez detekce v intervalu 24 hodin po PHx. Náš nález apoptotických tělísek je rovněž v souladu s uvedenou prací, neboť v ní autoři prokázali určité lokální maximum exprese pro-apoptického Bad a naopak nízkou expresi anti-apoptického Bcl-x v intervalu 24 hodin po PHx.

Mezi další anti-proliferační mechanismy EGCG patří změny v proteinech regulujících buněčný cyklus, obzvláště indukce inhibitorů cyklin-dependentních kináz p21 a p27 (Smith et al., 2002, Gupta et al., 2003, Liang et al., 1999), jakož i zvýšená exprese a fosforylace proteinu p53 na serinovém reziduu (Roy et al., 2005, Hastak et al., 2003). V naší práci se nepodařilo prokázat rozdíl v expresi proteinů p21 a p27 mezi hepatektomovanými skupinami. Exprese fosforylovaného p53 se jevila zvýšená ve skupině EGCG20+PHx a překvapivě snížená ve skupině EGCG50+PHx oproti neovlivněné skupině AI+PHx. Celá řada dalších anti-proliferačních mechanismů EGCG byla popsána, např. změny v proteinkinázách, růstových faktorech a transkripčních faktorech (Singh et al., 2011), např. inhibice NF- $\kappa$ B (Yang et al., 2001).

Abychom ověřili aktivaci dráhy Nrf2, změřili jsme expresi genů Hmox1 a Nqo1, které patří mezi efekторы Nrf2 (Wu et al., 2006, Sahin et al., 2010), na úrovni mRNA. Avšak s ohledem na malý počet vzorků jsme nebyli schopni prokázat aktivaci této signální dráhy.

Zajímavé bylo zjištění, že EGCG vedl k vyšší glykémii ve srovnání s potkany dostávajícími vodu pro injekce; toto je poněkud v rozporu s výsledky jiných autorů (Wolfram et al., 2006, Collins et al., 2007). Zatímco enterálně podávaný EGCG snižuje absorpci glukózy ze střeva, parenterálně podaný EGCG inhibuje vychytávání glukózy ve tkáních (Park et al., 2009).



Navzdory tomu, že některé antioxidanty byly schopny urychlit regeneraci jater po PHx, jak bylo popsáno ve studiích s vitamíny C a E (Ronco et al., 2002) a bicyklolem (Yao et al., 2009), jiné antioxidanty a hepatoprotektiva vykazovaly spíše inhibiční účinek na regeneraci jater po PHx, konkrétně resveratrol (Kirimlioglu et al., 2008), kurkumin (Seehofer et al., 2010) a S-adenosylmethionin (Kohoutek et al., 2010). Vzhledem k mnohdy komplexnímu účinku látek přírodního původu a antioxidantů jsou tyto rozpory pochopitelné. Příkladem různého účinku v různých modelech bylo imunosupresivum sirolimus, který sice dokázal zmírnit ischemicko-reperfúzní poškození, ale zhoršil regeneraci jater po PHx (Liu et al., 2010).

V navazující *in vitro* studii jsme prokázali toxický účinek EGCG na hepatocyty izolované z potkanů po parciální hepatektomii i laparotomii. Na rozdíl od jiných autorů (Galati et al., 2006), kteří popsali toxicitu od koncentrace 200  $\mu\text{mol/l}$ , jsme pozorovali mírnou, nicméně signifikantní toxicitu již při koncentraci EGCG 10  $\mu\text{mol/l}$  po 24hodinové kultivaci. Tento rozdíl mohl být způsoben použitím jiného kmene potkanů, odlišnostmi během izolace a/nebo kultivace, případně předchozí expozicí našich potkanů celkové anestezii a chirurgickému výkonu. Toto vysvětlení je podpořeno studiemi s myšmi, kde autoři popsali výrazné rozdíly v citlivosti již mezi jednotlivými kmeny (Goodin et al., 2006). Naproti tomu Collins et al. (2007) pozorovali toxicitu EGCG již od koncentrace 10  $\mu\text{mol/l}$  u primárních myších hepatocytů.

Produkce ROS nebyla v *in vitro* podmínkách jasně inhibována ani indukována. Kupodivu při nízkých koncentracích EGCG vykazovaly hepatocyty z potkanů po PHx nižší produkci ROS než potkani po LAP, což je v rozporu s jinými autory (Frances et al., 2007). Rozdílné výsledky mohou být vysvětleny odlišným designem studie: Frances et al. (Frances et al., 2007) izolovali hepatocyty jednu hodinu po chirurgickém zákroku, zatímco my jsme použili 24hodinový interval. Dále jsme zaznamenali trend k vyšší lipoperoxidaci u hepatocytů z potkanů po PHx než u potkanů po LAP.

V jiném experimentu jsme sledovali účinek EGCG na izolované mitochondrie. Zde jsme zjistili na dávce závislé rozpřažení oxidativní fosforylace a známky poškození vnitřní mitochondriální membrány při působení EGCG o koncentraci 200  $\mu\text{mol/l}$ . Dále jsme potvrdili toxický účinek EGCG vůči primárním hepatocytům po 24hodinovém působení již od koncentrace 10  $\mu\text{mol/l}$  (Kucera et al., 2015).

Jak bylo možné očekávat, hepatocyty izolované z potkanů po PHx vykazovaly trend k vyšší inkorporaci BrdU než buňky z potkanů po LAP. EGCG vedl k poklesu závislému na dávce, což poukazuje na inhibici syntézy DNA. Toto je v souladu s popisovaným anti-proliferačním účinkem (Singh et al., 2011). Zajímavé je, že inkorporace BrdU byla u buněk vystavených vysokým koncentracím EGCG vyšší než kontrola. Ve světle ostatních použitých metod lze toto odůvodnit poklesem celkového počtu buněk.

Důležitým zjištěním naší studie byla aktivace kaspáz 3 a 7 působením EGCG v podmínkách *in vitro*. Toto je v souladu s jeho protinádorovými účinky (Singh et al., 2011, Abou El Naga et al., 2013) a v rozporu s jinými autory (Thangapandiyana a Miltonprabu, 2013). Rozdílná zjištění mohla být způsobena komplexním účinkem EGCG, který zřejmě jinak působí na nádorové buňky, na buňky vystavené toxinům a na hepatocyty izolované z regenerujících jater. Účinek EGCG se zdá být závislý na způsobu poškození, jinými slovy je “stres-dependentní” (Crispo et al., 2010). Aktivita kaspáz 3 a 7 byly vyšší u hepatocytů z hepatektomovaných potkanů než u laparotomovaných. Tento nálezn je v souladu s našimi výsledky *in vivo* a může být vysvětlen maximem pro-apoptotických proteinů (které jsou jinak během regenerace jater downregulovány) v intervalu 24 h po PHx (Tzung et al., 1997).

EGCG byl schopen potlačit expresi Bcl-2 v nádorových buňkách (Singh et al., 2011, Abou El Naga et al., 2013). Podle jedné klinické studie zaměřené na pacienty s nealkoholovým ztukováním jater byly sérové hladiny Bcl-2 nižší u pacientů s nealkoholovou steatohepatitidou než u pacientů s prostou steatózou; navrženo bylo i diagnostické použití tohoto proteinu (Tarantino et al., 2011). Ani v našich *in vitro* experimentech se nám nepodařilo detekovat Bcl-2 na úrovni proteinu; na tento fenomén však narazili i jiní autoři (Tzung et al., 1997).

Aktivace fosforylovaného proteinu p53, která je jedním z antiproliferačních mechanismů EGCG (Singh et al., 2011), se v našich *in vitro* experimentech nelišila. Nedávno byla popsána upregulace DR5 a dalších receptorů zúčastněných v buněčné smrti po expozici EGCG; to pak vedlo ke zvýšené náchylnosti buněčné linie HepG2 k apoptóze (Abou El Naga et al., 2013). Avšak v naší studii se nepodařilo prokázat rozdíl mezi skupinami ani v expresi DR5, tj. ani dávka EGCG ani typ operace zřetelně expresi DR5 neovlivnily.

Dalším možným vysvětlením toxicity EGCG je deplece redukovaného glutathionu (Galati et al., 2006); toto však bylo pozorováno při vyšších dávkách, než byly testovány v naší studii. EGCG vedl k depleci GSH při některých, ale nikoliv všech, stresových podmínkách v PC12 buňkách (Crispo et al., 2010). GSH se podílí na schopnosti proteinu Bcl-2 inhibovat apoptózu. Vyčerpání GSH může buňky učinit náchylnější k apoptóze (Voehringer, 1999, Pierce et al., 2000), případně i nekróze (Nagai et al., 2002). Nedostatek GSH vede ke zvýšené aktivaci c-Jun N-terminální kinázy (JNK) a tím i náchylnosti k působení TNF- $\alpha$  (Wullaert et al., 2006, Matsumaru et al., 2003).

Nejen naše výsledky, ale i další studie doporučují opatrnost při užívání EGCG. Ten je přítomen v řadě volně prodejných výtažků ze zeleného čaje (Isbrucker et al., 2006, Lambert et al., 2010) a dokonce i v některých bylinných doplňcích stravy, které na přítomnost katechinů neupozorňují (Navarro et al., 2013). Tyto doplňky nejsou bez rizika – bylo popsáno několik případů akutního selhání jater způsobeného výtažky ze zeleného čaje (Molinari et al., 2006, Mazzanti et al., 2009, Chen et al., 2010). Ačkoliv tato poškození mohou být zčásti vysvětlena toxicitou ostatních látek v těchto doplňcích (např. kofein nebo nezjištěné kontaminanty), EGCG sám o sobě je schopen významných lékových interakcí (Shim a Saab, 2009, Schonthal, 2011) a pro-oxidačního účinku ve vysokých dávkách (Mazzanti et al., 2009, Galati et al., 2006). U myší byla dávka 120 mg/kg podaná intraperitoneálně hepatotoxická, dávka 150 mg/kg letální pro všechny myši (Galati et al., 2006); dávka 1500 mg/kg podávaná žaludeční sondou byla letální pro 85% myší (Lambert et al., 2010). U potkanů byla letální dávka 2000 mg/kg při podání žaludeční sondou. Nedávno byl popsán cholestatický účinek EGCG (Hirsova et al., 2013); vyšší hladiny konjugovaného bilirubinu (byť nesignifikantně) u potkanů dostávajících EGCG v našem experimentu jsou v souladu s těmito údaji.

Farmakokinetické studie s EGCG u potkanů prokázaly maximální plazmatickou koncentraci EGCG 4,7  $\mu\text{g/ml}$  po nitrožilním podání 10 mg/kg tělesné hmotnosti. Distribucí do tkání poklesne plazmatická koncentrace EGCG o jeden řád během méně než 100 minut. Po podání EGCG žaludeční sondou v dávce 75 mg/kg tělesné hmotnosti dosáhla maximální plazmatická koncentrace pouze 19,8 ng/ml (Chen et al., 1997). Nejnižší koncentrace použitá v naší studii, tj. 1  $\mu\text{mol/l}$ , odpovídá 0,46  $\mu\text{g/ml}$ ; iniciální toxická koncentrace 10  $\mu\text{mol/l}$  pak 4,58  $\mu\text{g/ml}$  a nejvyšší použitá koncentrace 15  $\mu\text{mol/l}$  odpovídá 6,87  $\mu\text{g/ml}$ . Tím pádem koncentrace použité v našich *in vitro* experimentech se mohou objevit v krátkém intervalu po intravenózním podání EGCG. To může i vysvětlit známky toxicity při podání vyšší dávky EGCG (50 mg/kg) v uvedeném *in vivo* experimentu.

Je potřeba zdůraznit, že farmakokinetika je u hlodavců jiná než u člověka: jedna perorální dávka 1600 mg EGCG (přibližně 22,2 mg/kg tělesné hmotnosti) vedla k plazmatické koncentraci 3,39  $\mu\text{g/ml}$ ; tato dávka byla shledána bezpečnou a dobře tolerovanou (Ullmann et al., 2003). Hypoteticky, pokud bychom předpokládali podobnou citlivost lidských hepatocytů, bylo by nadužívání doplňků s EGCG nebezpečné v perioperačním období. Na druhou stranu po vypití ekvivalentu dvou šálků čaje dosahuje maximální plazmatická koncentrace EGCG pouze 0,17  $\mu\text{M}$  (odpovídá 78,2 ng/ml), což poukazuje na bezpečnost střídavého pití zeleného čaje (Lee et al., 2002). Případné použití EGCG v klinických studiích je ztíženo také obtížně předpověditelnou biodostupností (Mereles a Hunstein, 2011).

Limitem našich experimentů je použití pouze samců jednoho kmene potkanů. Jak ukázali jiní autoři, již i samotný kmen daného živočišného druhu může významně ovlivnit náchylnost k toxicitě EGCG (Goodin et al., 2006).

## 5.2 Část druhá: vliv genotypu apolipoproteinu E na hepatotoxicitu

V našich experimentech vedl acetaminofen (APAP) k toxicitě vůči hepatocytům všech genotypů; tato toxicita byla na dávce závislá. Náchylnost hepatocytů byla vyšší u obou transgenních kmenů oproti wild-type kontrolám a nejvíce vyjádřená u ApoE3 myší. Při expozici 4 mmol/l APAP po dobu 24 hodin vykazovaly téměř všechny buňky známky buněčné smrti nekrózou.

Podařilo se nám reprodukovat hlavní výsledky týmu Graeser et al. (2011), tj. vyšší expresi Nrf2-dependentních genů v kultivovaných hepatocytech získaných z ApoE3 myší než u těch z ApoE4 myší, alespoň tedy při nízkých dávkách APAP. Působením APAP došlo k aktivaci některých Nrf2-dependentních genů u všech testovaných genotypů, což je v souladu s výsledky jiných autorů (Mobasher et al., 2013). Naše nálezy poklesu mitochondriálního membránového potenciálu po působení APAP jsou v souladu s dříve publikovanou prací týmu autorů Hwang et al. (2014). I tentokrát byl tento pokles nejvíce vyjádřen u hepatocytů z ApoE3 myší.

Aktivita kaspáz 3 a 7 nebyla zvýšená po 24hodinové expozici APAP navzdory downregulaci antiapoptotického proteinu Bcl-2 v dřívějším časovém intervalu. Ve světle ostatních použitých metod se můžeme domnívat, že pokles aktivity kaspáz při nejvyšší, tj. 4 mmol/l koncentraci APAP, byl dán poklesem celkového počtu buněk na podkladě nekrózy. Stejně výsledky však byly získány i při přepočítání této aktivity na množství proteinu. Naše výsledky jsou v souladu se zjištěním autorů Ni et al., kteří popisují buněčnou smrt pouze nekrózou (Ni et al., 2012a) a v rozporu s nálezy autorů Mobasher et al, kteří rovněž zaznamenali aktivaci apoptózy (Mobasher et al., 2013). Tato rozdílnost mohla být způsobena různě dlouhými dobami expozice, kultivačními podmínkami, koncentracemi APAP a metodami kvantifikace apoptózy.

Vyšší toxicita APAP u obou transgenních kmenů oproti wild-type kontrolám může být zčásti vysvětlena akumulací lipidů. V předchozích studiích byly hepatocyty zasažené nealkoholovým ztukováním náchylnější k toxicitě APAP než kontrolní hepatocyty (Kucera et al., 2012a, Kon et al., 2010). V nynější práci se nepodařilo potvrdit nález týmu Graeser et al., kteří popsali vyšší obsah triacylglycerolů u ApoE4 než u ApoE3 myší (Graeser et al., 2011).

Dále jsme zaznamenali prudký nárůst produkce ROS při 24hodinové kultivaci s 2,5 mmol/l APAP u obou transgenních kmenů, ale nikoliv u WT myši. Překvapivě byl relativní nárůst nejvyšší v hepatocytech z ApoE3 myši. Pokles hladiny intracelulárního glutathionu byl zaznamenán ve všech testovaných genotypch. Toto je v souladu s předchozími studiemi a nálezem deplece GSH po expozici APAP (Mobasher et al., 2013, Kon et al., 2010). Po 24hodinovém působení APAP byl tento pokles nejvíce vyjádřen v ApoE3 hepatocytech. Tyto nálezy byly poněkud mimo naše očekávání, neboť nositelé alely ApoE3 měli zjištěnu vyšší antioxidační schopnost než nositelé alely ApoE4 (Jofre-Monseny et al., 2008). Oba transgenní kmeny vykazovaly vyšší konjugaci APAP s glutathionem než WT myši.

Nedávno byla popsána souvislost mezi dráhou Nrf2 a autofagií (Ni et al., 2014). V naší studii jsme zaznamenali nižší hladiny fosforylovaného 4E-BP1, efektoru mTOR, u obou transgenních kmenů po expozici 4 mmol/l APAP, což poukazuje na aktivaci autofagie. Toto je v souladu s aktivací autofagie po působení APAP (Ni et al., 2012a). Vzhledem k výraznějšímu poklesu fosforylovaného 4E-BP1 u ApoE4 než u ApoE3 hepatocytů lze uvažovat, že míra aktivace autofagie se liší mezi těmito transgenními kmeny.

## 6. Závěry

### 6.1 Část první: vliv epigallocatechingalátu na játra

Podání EGCG v testovaných dávkách 20 mg/kg a 50 mg/kg nevedlo k urychlení regenerace jater po parciální hepatektomii potkanů. Vyšší dávka dokonce vedla ke snížení syntézy DNA. Ačkoliv provedené analýzy neobjasnily zcela mechanismus tohoto účinku, může být dán inhibicí produkce cytokinu IL-6, zřejmě však nikoliv indukcí apoptózy ani aktivací proteinu p53.

Po 24hodinové kultivaci vykazoval EGCG v koncentraci 10  $\mu\text{mol/l}$  a vyšší toxické účinky na hepatocyty izolované jak z potkanů po laparotomii, tak z potkanů po parciální hepatektomii. Hepatocyty izolované z potkanů po parciální hepatektomii měly vyšší tendenci k apoptóze, zejména při vysokých koncentracích EGCG.

### 6.2 Část druhá: vliv genotypu apolipoproteinu E na hepatotoxicitu

Acetaminofen vedl k hepatotoxicitě, která byla na dáce závislá, a to u hepatocytů izolovaných z myší se všemi sledovanými genotypy ApoE3, ApoE4 i WT. Toxicita byla vyšší u obou transgenních kmenů oproti wild-type kontrolám a nejvíce vyjádřená byla u ApoE3 myší. Při expozici 4 mmol/l APAP po dobu 24 hodin vykazovaly téměř všechny buňky známky nekrózy bez ohledu na genotyp.

Na základě naší studie lze konstatovat, že pravděpodobně několik mechanismů může vést k horšímu poškození u ApoE3 myší oproti ApoE4 myším: vyšší produkce reaktivních forem kyslíku při expozici vysokým dávkám acetaminofenu, vyšší konzumpce glutathionu, vyšší náchylnost mitochondrií k poškození a zřejmě i rozdílná aktivace autofagie po expozici acetaminofenu. Zároveň jsme prokázali vyšší aktivaci Nrf2-dependentních genů u hepatocytů z ApoE3 myší než u hepatocytů z ApoE4 myší, alespoň tedy při nízkých koncentracích acetaminofenu.

*In vivo* studie by byly vhodné k potvrzení našich výsledků na celých zvířatech a k objasnění některých mechanismů.

## 7. Použitá literatura

- ABE, K., IJIRI, M., SUZUKI, T., TAGUCHI, K., KOYAMA, Y. & ISEMURA, M. Green tea with a high catechin content suppresses inflammatory cytokine expression in the galactosamine-injured rat liver. *Biomed Res*, 2005, **26**(5), 187-192.
- ABOU EL NAGA, R. N., AZAB, S. S., EL-DEMERDASH, E., SHAARAWY, S., EL-MERZABANI, M. & AMMAR EL, S. M. Sensitization of TRAIL-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells by phytochemicals. *Life Sci*, 2013, **92**(10), 555-561.
- ABU-AMARA, M., GURUSAMY, K., HORI, S., GLANTZOUNIS, G., FULLER, B. & DAVIDSON, B. R. Systematic review of randomized controlled trials of pharmacological interventions to reduce ischaemia-reperfusion injury in elective liver resection with vascular occlusion. *HPB (Oxford)*, 2010, **12**(1), 4-14.
- ABU-AMARA, M., GURUSAMY, K. S., HORI, S., GLANTZOUNIS, G., FULLER, B. & DAVIDSON, B. R. Pharmacological interventions versus no pharmacological intervention for ischaemia reperfusion injury in liver resection surgery performed under vascular control. *Cochrane Database Syst Rev*, 2009, (4), CD007472.
- AGGARWAL, B. B. & SHISHODIA, S. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochem Pharmacol*, 2006, **71**(10), 1397-1421.
- AKERMAN, P., COTE, P., YANG, S. Q., MCCLAIN, C., NELSON, S., BAGBY, G. J. & DIEHL, A. M. Antibodies to tumor necrosis factor-alpha inhibit liver regeneration after partial hepatectomy. *Am J Physiol*, 1992, **263**(4 Pt 1), G579-585.
- AL-MEHDY, A., SHUMAN, H. & FISHER, A. B. Fluorescence microtopography of oxidative stress in lung ischemia-reperfusion. *Lab Invest*, 1994, **70**(4), 579-587.
- BADER, A., PAVLICA, S., DEIWICK, A., LOTKOVA, H., KUCERA, O., DARSOW, K., BARTEL, S., SCHULZE, M., LANGE, H. A. & CERVINKOVA, Z. Proteomic analysis to display the effect of low doses of erythropoietin on rat liver regeneration. *Life Sci*, 2011, **89**(23-24), 827-833.
- BAHCECIOGLU, I. H., KOCA, S. S., POYRAZOGLU, O. K., YALNIZ, M., OZERCAN, I. H., USTUNDAG, B., SAHIN, K., DAGLI, A. F. & ISIK, A. Hepatoprotective effect of infliximab, an anti-TNF-alpha agent, on carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis. *Inflammation*, 2008, **31**(4), 215-221.
- BAHDE, R. & SPIEGEL, H. U. Hepatic ischaemia-reperfusion injury from bench to bedside. *Br J Surg*, 2010, **97**(10), 1461-1475.
- BAJT, M. L., KNIGHT, T. R., LEMASTERS, J. J. & JAESCHKE, H. Acetaminophen-induced oxidant stress and cell injury in cultured mouse hepatocytes: protection by N-acetyl cysteine. *Toxicol Sci*, 2004, **80**(2), 343-349.
- BERRY, M. N., EDWARDS, A. M. & BARRITT, G. J. (1991) High-yield preparation of isolated hepatocytes from rat liver. IN BURDON, R. H. & VAN KNIPPENBERG, P. H. (Eds.) *Isolated Hepatocytes Preparation, Properties and Application*. New York, Elsevier.
- BEYER, T. A., XU, W., TEUPSER, D., AUF DEM KELLER, U., BUGNON, P., HILDT, E., THIERY, J., KAN, Y. W. & WERNER, S. Impaired liver regeneration in Nrf2 knockout mice: role of ROS-mediated insulin/IGF-1 resistance. *EMBO J*, 2008, **27**(1), 212-223.
- BILZER, M., JAESCHKE, H., VOLLMAR, A. M., PAUMGARTNER, G. & GERBES, A. L. Prevention of Kupffer cell-induced oxidant injury in rat liver by atrial natriuretic peptide. *Am J Physiol*, 1999, **276**(5 Pt 1), G1137-1144.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, **72**, 248-254.
- CAMPO, G. M., SQUADRITO, F., CECCARELLI, S., CALO, M., AVENOSO, A., CAMPO, S., SQUADRITO, G. & ALTAVILLA, D. Reduction of carbon tetrachloride-induced rat liver injury by IRFI 042, a novel dual vitamin E-like antioxidant. *Free Radic Res*, 2001, **34**(4), 379-393.
- CERVINKOVA, Z., SIMEK, J. & TROJOVSKA, V. Effect of triiodothyronine or etiroxate on DNA synthesis in intact and regenerating liver. *Physiol Bohemoslov*, 1984, **33**(6), 501-506.



- COLLINS, Q. F., LIU, H. Y., PI, J., LIU, Z., QUON, M. J. & CAO, W. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG), a green tea polyphenol, suppresses hepatic gluconeogenesis through 5'-AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem*, 2007, **282**(41), 30143-30149.
- CORPECHOT, C., BENLIAN, P., BARBU, V., CHAZOUILLÈRES, O., POUPON, R. E. & POUPON, R. Apolipoprotein E polymorphism, a marker of disease severity in primary biliary cirrhosis? *Journal of Hepatology*, 2001, **35**(3), 324-328.
- CRISPO, J. A., ANSELL, D. R., PICHE, M., EIBL, J. K., KHAPER, N., ROSS, G. M. & TAI, T. C. Protective effects of polyphenolic compounds on oxidative stress-induced cytotoxicity in PC12 cells. *Can J Physiol Pharmacol*, 2010, **88**(4), 429-438.
- CURZIO, M., ESTERBAUER, H., DI MAURO, C., CECCHINI, G. & DIANZANI, M. U. Chemotactic activity of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal and homologous hydroxyalkenals. *Biol Chem Hoppe Seyler*, 1986, **367**(4), 321-329.
- ČERVINKOVÁ, Z., KŘIVÁKOVÁ, P., LÁBAJOVÁ, A., ROUŠAR, T., LOTKOVÁ, H., KUČERA, O., ENDLICHER, R., ČERVINKA, M. & DRAHOTA, Z. Mechanisms participating in oxidative damage of isolated rat hepatocytes. *Archives of Toxicology*, 2009, **83**(4), 363-372.
- DAYOUB, R., VOGEL, A., SCHUETT, J., LUPKE, M., SPIEKER, S. M., KETTERN, N., HILDT, E., MELTER, M. & WEISS, T. S. Nrf2 activates augmenter of liver regeneration (ALR) via antioxidant response element and links oxidative stress to liver regeneration. *Mol Med*, 2013, **19**, 237-244.
- DE FEO, E., CEFALO, C., ARZANI, D., AMORE, R., LANDOLFI, R., GRIECO, A., RICCIARDI, W., MIELE, L. & BOCCIA, S. A case-control study on the effects of the apolipoprotein e genotypes in nonalcoholic fatty liver disease. *Molecular Biology Reports*, 2012, **39**(7), 7381-7388.
- DEMIRAG, M. D., ONEN, H. I., KARAOGUZ, M. Y., DOGAN, I., KARAKAN, T., EKMEKCI, A. & GUZ, G. Apolipoprotein E gene polymorphism in nonalcoholic fatty liver disease. *Dig Dis Sci*, 2007, **52**(12), 3399-3403.
- DINKOVA-KOSTOVA, A. T. & TALALAY, P. Direct and indirect antioxidant properties of inducers of cytoprotective proteins. *Mol Nutr Food Res*, 2008, **52** Suppl 1S128-138.
- DUBERN, B. & CLEMENT, K. Leptin and leptin receptor-related monogenic obesity. *Biochimie*, 2012, **94**(10), 2111-2115.
- ENDLICHER, R., KŘIVÁKOVÁ, P., RAUCHOVÁ, H., NUSKOVÁ, H., ČERVINKOVÁ, Z. & DRAHOTA, Z. Peroxidative damage of mitochondrial respiration is substrate-dependent. *Physiol Res*, 2009, **58**(5), 685-692.
- ENOMOTO, A., ITOH, K., NAGAYOSHI, E., HARUTA, J., KIMURA, T., O'CONNOR, T., HARADA, T. & YAMAMOTO, M. High sensitivity of Nrf2 knockout mice to acetaminophen hepatotoxicity associated with decreased expression of ARE-regulated drug metabolizing enzymes and antioxidant genes. *Toxicol Sci*, 2001, **59**(1), 169-177.
- FENG, Y., PAUL, I. A. & LEBLANC, M. H. Nicotinamide reduces hypoxic ischemic brain injury in the newborn rat. *Brain Res Bull*, 2006, **69**(2), 117-122.
- FIGARSKA, S. M., VONK, J. M. & BOEZEN, H. M. NFE2L2 polymorphisms, mortality, and metabolism in the general population. *Physiol Genomics*, 2014, **46**(12), 411-417.
- FIORINI, R. N., DONOVAN, J. L., RODWELL, D., EVANS, Z., CHENG, G., MAY, H. D., MILLIKEN, C. E., MARKOWITZ, J. S., CAMPBELL, C., HAINES, J. K., SCHMIDT, M. G. & CHAVIN, K. D. Short-term administration of (-)-epigallocatechin gallate reduces hepatic steatosis and protects against warm hepatic ischemia/reperfusion injury in steatotic mice. *Liver Transpl*, 2005, **11**(3), 298-308.
- FRANCES, D., RONCO, M. T., OCHOA, E., ALVAREZ, M. L., QUIROGA, A., PARODY, J. P., MONTI, J., CARRILLO, M. C. & CARNOVALE, C. E. Oxidative stress in primary culture hepatocytes isolated from partially hepatectomized rats. *Can J Physiol Pharmacol*, 2007, **85**(10), 1047-1051.
- GALATI, G., LIN, A., SULTAN, A. M. & O'BRIEN, P. J. Cellular and in vivo hepatotoxicity caused by green tea phenolic acids and catechins. *Free Radic Biol Med*, 2006, **40**(4), 570-580.
- GAMBINO, R., MUSSO, G. & CASSADER, M. Redox balance in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease: mechanisms and therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal*, 2011, **15**(5), 1325-1365.

- GIAKOUSTIDIS, D. E., GIAKOUSTIDIS, A. E., ILIADIS, S., KOLIAKOU, K., ANTONIADIS, N., KONTOS, N., PAPANIKOLAOU, V., PAPAGEORGIOU, G., KALDRIMIDOU, E. & TAKOUDAS, D. Attenuation of liver ischemia/reperfusion induced apoptosis by epigallocatechin-3-gallate via down-regulation of NF-kappaB and c-Jun expression. *J Surg Res*, 2010, **159**(2), 720-728.
- GOODIN, M. G., BRAY, B. J. & ROSENGREN, R. J. Sex- and strain-dependent effects of epigallocatechin gallate (EGCG) and epicatechin gallate (ECG) in the mouse. *Food Chem Toxicol*, 2006, **44**(9), 1496-1504.
- GRAESER, A. C., BOESCH-SAADATMANDI, C., LIPPMANN, J., WAGNER, A. E., HUEBBE, P., STORM, N., HOPFNER, W., WISWEDEL, I., GARDEMANN, A., MINIHANE, A. M., DORING, F. & RIMBACH, G. Nrf2-dependent gene expression is affected by the proatherogenic apoE4 genotype-studies in targeted gene replacement mice. *J Mol Med (Berl)*, 2011, **89**(10), 1027-1035.
- GUPTA, S., HUSSAIN, T. & MUKHTAR, H. Molecular pathway for (-)-epigallocatechin-3-gallate-induced cell cycle arrest and apoptosis of human prostate carcinoma cells. *Arch Biochem Biophys*, 2003, **410**(1), 177-185.
- GURUSAMY, K. S., GONZALEZ, H. D. & DAVIDSON, B. R. Current protective strategies in liver surgery. *World J Gastroenterol*, 2010, **16**(48), 6098-6103.
- HABEOS, I. G., ZIROS, P. G., CHARTOUMPEKIS, D., PSYROGIANNIS, A., KYRIAZOPOULOU, V. & PAPAVALASSILIOU, A. G. Simvastatin activates Keap1/Nrf2 signaling in rat liver. *J Mol Med (Berl)*, 2008, **86**(11), 1279-1285.
- HALLIWELL, B. (2001) Free Radicals and Other Reactive Species in Disease. *eLS*. John Wiley & Sons, Ltd.
- HAN, S. Y., CHANG, E. J., CHOI, H. J., NAM, S. I., LEE, N. H., KWAK, C. S., PARK, S. B., KIM, H. C. & MUN, K. C. Total antioxidant status and oxygen free radicals during hepatic regeneration. *Transplant Proc*, 2006, **38**(7), 2214-2215.
- HASTAK, K., GUPTA, S., AHMAD, N., AGARWAL, M. K., AGARWAL, M. L. & MUKHTAR, H. Role of p53 and NF-kappaB in epigallocatechin-3-gallate-induced apoptosis of LNCaP cells. *Oncogene*, 2003, **22**(31), 4851-4859.
- HAYES, J. D. & MCLELLAN, L. I. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radic Res*, 1999, **31**(4), 273-300.
- HIGGINS, G. M. & ANDERSON, R. M. Experimental pathology of the liver. I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol.*, 1931, **12**186-202.
- HIRANUMA, S., ITO, K., NODA, Y., OZASA, H., KOIKE, Y. & HORIKAWA, S. Amelioration of hepatic ischemia/reperfusion injury in the remnant liver after partial hepatectomy in rats. *J Gastroenterol Hepatol*, 2007, **22**(12), 2167-2172.
- HIRSOVA, P., KARLASOVA, G., DOLEZELOVA, E., CERMANOVA, J., ZAGOROVA, M., KADOVA, Z., HROCH, M., SISPERA, L., TOMSIK, P., LENICEK, M., VITEK, L., PAVEK, P., KUCERA, O., CERVINKOVA, Z. & MICUDA, S. Cholestatic effect of epigallocatechin gallate in rats is mediated via decreased expression of Mrp2. *Toxicology*, 2013, **303**9-15.
- HIRSOVA, P., KOLOUCHOVA, G., DOLEZELOVA, E., CERMANOVA, J., HYSPLER, R., KADOVA, Z. & MICUDA, S. Epigallocatechin gallate enhances biliary cholesterol secretion in healthy rats and lowers plasma and liver cholesterol in ethinylestradiol-treated rats. *Eur J Pharmacol*, 2012, **691**(1-3), 38-45.
- HISSIN, P. J. & HILF, R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem*, 1976, **74**(1), 214-226.
- HOLTZCLAW, W. D., DINKOVA-KOSTOVA, A. T. & TALALAY, P. Protection against electrophile and oxidative stress by induction of phase 2 genes: the quest for the elusive sensor that responds to inducers. *Adv Enzyme Regul*, 2004, **44**335-367.
- HWANG, J., KIM, Y.-H., NOH, J.-R., GANG, G.-T., KIM, K.-S., CHUNG, H., TADI, S., YIM, Y.-H., SHONG, M. & LEE, C.-H. The protective role of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 on acetaminophen-induced liver injury is associated with prevention of adenosine triphosphate depletion and improvement of mitochondrial dysfunction. *Archives of Toxicology*, 2014, 1-8.

- CHAUDHRY, A. S., URBAN, T. J., LAMBA, J. K., BIRNBAUM, A. K., REMMEL, R. P., SUBRAMANIAN, M., STROM, S., YOU, J. H., KASPERAVICIUTE, D., CATARINO, C. B., RADTKE, R. A., SISODIYA, S. M., GOLDSTEIN, D. B. & SCHUETZ, E. G. CYP2C9\*1B promoter polymorphisms, in linkage with CYP2C19\*2, affect phenytoin autoinduction of clearance and maintenance dose. *J Pharmacol Exp Ther*, 2010, **332**(2), 599-611.
- CHEN, G. C., RAMANATHAN, V. S., LAW, D., FUNCHAIN, P., CHEN, G. C., FRENCH, S., SHLOPOV, B., EYSSELEIN, V., CHUNG, D., REICHER, S. & PHAM, B. V. Acute liver injury induced by weight-loss herbal supplements. *World J Hepatol*, 2010, **2**(11), 410-415.
- CHEN, J. H., TIPOE, G. L., LIONG, E. C., SO, H. S., LEUNG, K. M., TOM, W. M., FUNG, P. C. & NANJII, A. A. Green tea polyphenols prevent toxin-induced hepatotoxicity in mice by down-regulating inducible nitric oxide-derived prooxidants. *Am J Clin Nutr*, 2004, **80**(3), 742-751.
- CHEN, L., LEE, M. J., LI, H. & YANG, C. S. Absorption, distribution, elimination of tea polyphenols in rats. *Drug Metab Dispos*, 1997, **25**(9), 1045-1050.
- CHILAKAPATI, J., KORRAPATI, M. C., HILL, R. A., WARBRITTON, A., LATENDRESSE, J. R. & MEHENDALE, H. M. Toxicokinetics and toxicity of thioacetamide sulfoxide: a metabolite of thioacetamide. *Toxicology*, 2007, **230**(2-3), 105-116.
- CHOWDHRY, S., NAZMY, M. H., MEAKIN, P. J., DINKOVA-KOSTOVA, A. T., WALSH, S. V., TSUJITA, T., DILLON, J. F., ASHFORD, M. L. & HAYES, J. D. Loss of Nrf2 markedly exacerbates nonalcoholic steatohepatitis. *Free Radic Biol Med*, 2010, **48**(2), 357-371.
- CHUNG, M. Y., PARK, H. J., MANAUTOU, J. E., KOO, S. I. & BRUNO, R. S. Green tea extract protects against nonalcoholic steatohepatitis in ob/ob mice by decreasing oxidative and nitrative stress responses induced by proinflammatory enzymes. *J Nutr Biochem*, 2012, **23**(4), 361-367.
- ISBRUCKER, R. A., EDWARDS, J. A., WOLZ, E., DAVIDOVICH, A. & BAUSCH, J. Safety studies on epigallocatechin gallate (EGCG) preparations. Part 2: dermal, acute and short-term toxicity studies. *Food Chem Toxicol*, 2006, **44**(5), 636-650.
- ISHIKAWA, S., IKEJIMA, K., YAMAGATA, H., AOYAMA, T., KON, K., ARAI, K., TAKEDA, K. & WATANABE, S. CD1d-restricted natural killer T cells contribute to hepatic inflammation and fibrogenesis in mice. *J Hepatol*, 2011, **54**(6), 1195-1204.
- JADEJA, R., DEVKAR, R. V. & NAMMI, S. Herbal medicines for the treatment of nonalcoholic steatohepatitis: current scenario and future prospects. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2014, **2014**648308.
- JAESCHKE, H. Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury. *J Gastroenterol Hepatol*, 2000, **15**(7), 718-724.
- JAESCHKE, H. & FARHOOD, A. Neutrophil and Kupffer cell-induced oxidant stress and ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Am J Physiol*, 1991, **260**(3 Pt 1), G355-362.
- JAESCHKE, H., GORES, G. J., CEDERBAUM, A. I., HINSON, J. A., PESSAYRE, D. & LEMASTERS, J. J. Forum - Mechanisms of hepatotoxicity. *Toxicological Sciences*, 2002, **65**(2), 166-176.
- JAESCHKE, H., HO, Y. S., FISHER, M. A., LAWSON, J. A. & FARHOOD, A. Glutathione peroxidase-deficient mice are more susceptible to neutrophil-mediated hepatic parenchymal cell injury during endotoxemia: importance of an intracellular oxidant stress. *Hepatology*, 1999, **29**(2), 443-450.
- JAESCHKE, H., KNIGHT, T. R. & BAJT, M. L. The role of oxidant stress and reactive nitrogen species in acetaminophen hepatotoxicity. *Toxicol Lett*, 2003a, **144**(3), 279-288.
- JAESCHKE, H., KNIGHT, T. R., LEMASTERS, J. J. & BAJT, M. Oxidant stress precedes liver injury after acetaminophen in cultured mouse hepatocytes. *Toxicological Sciences*, 2003b, **72**10-10.
- JAESCHKE, H. & LEMASTERS, J. J. Apoptosis versus oncotic necrosis in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Gastroenterology*, 2003, **125**(4), 1246-1257.
- JEONG, H. G., YOU, H. J., PARK, S. J., MOON, A. R., CHUNG, Y. C., KANG, S. K. & CHUN, H. K. Hepatoprotective effects of 18beta-glycyrrhetinic acid on carbon tetrachloride-induced liver injury: inhibition of cytochrome P450 2E1 expression. *Pharmacol Res*, 2002, **46**(3), 221-227.

- JOFRE-MONSENY, L., MINIHANE, A. M. & RIMBACH, G. Impact of apoE genotype on oxidative stress, inflammation and disease risk. *Mol Nutr Food Res*, 2008, **52**(1), 131-145.
- JUNG, K. A. & KWAK, M. K. The Nrf2 system as a potential target for the development of indirect antioxidants. *Molecules*, 2010, **15**(10), 7266-7291.
- KAGAYA, N., TAGAWA, Y., NAGASHIMA, H., SAIJO, R., KAWASE, M. & YAGI, K. Suppression of cytotoxin-induced cell death in isolated hepatocytes by tea catechins. *Eur J Pharmacol*, 2002, **450**(3), 231-236.
- KALAYARASAN, S., SRIRAM, N., SURESHKUMAR, A. & SUDHANDIRAN, G. Chromium (VI)-induced oxidative stress and apoptosis is reduced by garlic and its derivative S-allylcysteine through the activation of Nrf2 in the hepatocytes of Wistar rats. *J Appl Toxicol*, 2008, **28**(7), 908-919.
- KANG, H. J., HONG, Y. B., KIM, H. J., WANG, A. & BAE, I. Bioactive food components prevent carcinogenic stress via Nrf2 activation in BRCA1 deficient breast epithelial cells. *Toxicology Letters*, 2012a, **209**(2), 154-160.
- KANG, L. I., MARS, W. M. & MICHALOPOULOS, G. K. Signals and cells involved in regulating liver regeneration. *Cells*, 2012b, **1**(4), 1261-1292.
- KATUNUMA, N., MURATA, E., LE, Q. T., HAYASHI, Y. & OHASHI, A. New apoptosis cascade mediated by lysosomal enzyme and its protection by epigallo-catechin gallate. *Adv Enzyme Regul*, 2004, **44**1-10.
- KAVIARASAN, S., SUNDARAPANDIYAN, R. & ANURADHA, C. V. Epigallocatechin gallate, a green tea phytochemical, attenuates alcohol-induced hepatic protein and lipid damage. *Toxicol Mech Methods*, 2008, **18**(8), 645-652.
- KEHRER, J. P. & PARAIDATHATHU, T. The use of fluorescent probes to assess oxidative processes in isolated-perfused rat heart tissue. *Free Radic Res Commun*, 1992, **16**(4), 217-225.
- KHURANA, S., VENKATARAMAN, K., HOLLINGSWORTH, A., PICHE, M. & TAI, T. C. Polyphenols: benefits to the cardiovascular system in health and in aging. *Nutrients*, 2013, **5**(10), 3779-3827.
- KIM, M., YANG, S. G., KIM, J. M., LEE, J. W., KIM, Y. S. & LEE, J. I. Silymarin suppresses hepatic stellate cell activation in a dietary rat model of non-alcoholic steatohepatitis: analysis of isolated hepatic stellate cells. *Int J Mol Med*, 2012, **30**(3), 473-479.
- KIM, Y. R., OH, J. E., KIM, M. S., KANG, M. R., PARK, S. W., HAN, J. Y., EOM, H. S., YOO, N. J. & LEE, S. H. Oncogenic NRF2 mutations in squamous cell carcinomas of oesophagus and skin. *J Pathol*, 2010, **220**(4), 446-451.
- KIMURA, M., WATANABE, M., ISHIBASHI, N., YANAGIDA, S. & OGIHARA, M. Acyclic retinoid NIK-333 accelerates liver regeneration and lowers serum transaminase activities in 70% partially hepatectomized rats, in vivo. *Eur J Pharmacol*, 2010, **643**(2-3), 267-273.
- KIRIMLIOGLU, H., ECEVIT, A., YILMAZ, S., KIRIMLIOGLU, V. & KARABULUT, A. B. Effect of resveratrol and melatonin on oxidative stress enzymes, regeneration, and hepatocyte ultrastructure in rats subjected to 70% partial hepatectomy. *Transplant Proc*, 2008, **40**(1), 285-289.
- KLESZCZYNSKI, K., ERNST, I. M., WAGNER, A. E., KRUSE, N., ZILLIKENS, D., RIMBACH, G. & FISCHER, T. W. Sulforaphane and phenylethyl isothiocyanate protect human skin against UVR-induced oxidative stress and apoptosis: Role of Nrf2-dependent gene expression and antioxidant enzymes. *Pharmacol Res*, 2013, **78**C28-40.
- KNIGHT, T. R., KURTZ, A., BAJT, M. L., HINSON, J. A. & JAESCHKE, H. Vascular and hepatocellular peroxynitrite formation during acetaminophen toxicity: role of mitochondrial oxidant stress. *Toxicol Sci*, 2001, **62**(2), 212-220.
- KOHLER, U. A., KURINNA, S., SCHWITTER, D., MARTI, A., SCHAFFER, M., HELLERBRAND, C., SPEICHER, T. & WERNER, S. Activated Nrf2 impairs liver regeneration in mice by activation of genes involved in cell-cycle control and apoptosis. *Hepatology*, 2014, **60**(2), 670-678.
- KOHOUTEK, L., CERVINKOVA, Z., KUCERA, O., ROUSAR, T., GARNOL, T., SILLER, J. & LOTKOVA, H. Effect of S-adenosylmethionine on liver regeneration induced by partial hepatectomy. *Gen Physiol Biophys*, 2010, **29**(1), 72-78.

- KON, K., IKEJIMA, K., OKUMURA, K., ARAI, K., AOYAMA, T. & WATANABE, S. Diabetic KK-A(y) mice are highly susceptible to oxidative hepatocellular damage induced by acetaminophen. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2010, **299**(2), G329-337.
- KUCERA, O., AL-DURY, S., LOTKOVA, H., ROUSAR, T., RYCHTRMOC, D. & CERVINKOVA, Z. Steatotic rat hepatocytes in primary culture are more susceptible to the acute toxic effect of acetaminophen. *Physiol Res*, 2012a, **61 Suppl 2**S93-101.
- KUCERA, O., LOTKOVA, H., STANKOVA, P., PODHOLA, M., ROUSAR, T., MEZERA, V. & CERVINKOVA, Z. Is rat liver affected by non-alcoholic steatosis more susceptible to the acute toxic effect of thioacetamide? *Int J Exp Pathol*, 2011, **92**(4), 281-289.
- KUCERA, O., MEZERA, V., MORAVCOVA, A., ENDLICHER, R., LOTKOVA, H., DRAHOTA, Z. & CERVINKOVA, Z. In Vitro Toxicity of Epigallocatechin Gallate in Rat Liver Mitochondria and Hepatocytes. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015, **2015**10.
- KUCERA, O., ROUSAR, T., STANKOVA, P., HANACKOVA, L., LOTKOVA, H., PODHOLA, M. & CERVINKOVA, Z. Susceptibility of rat non-alcoholic fatty liver to the acute toxic effect of acetaminophen. *J Gastroenterol Hepatol*, 2012b, **27**(2), 323-330.
- KUČERA, O., ENDLICHER, R., ROUŠAR, T., LOTKOVÁ, H., GARNOL, T., DRAHOTA, Z. & ČERVINKOVÁ, Z. The Effect of tert-Butyl Hydroperoxide-Induced Oxidative Stress on Lean and Steatotic Rat Hepatocytes In Vitro. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014, **2014**1-12.
- KUMAR, H., KIM, I. S., MORE, S. V., KIM, B. W. & CHOI, D. K. Natural product-derived pharmacological modulators of Nrf2/ARE pathway for chronic diseases. *Natural Product Reports*, 2014, **31**(1), 109-139.
- KUZU, N., BAHCECIOGLU, I. H., DAGLI, A. F., OZERCAN, I. H., USTUNDAG, B. & SAHIN, K. Epigallocatechin gallate attenuates experimental non-alcoholic steatohepatitis induced by high fat diet. *J Gastroenterol Hepatol*, 2008, **23**(8 Pt 2), e465-470.
- KWAK, M. K. & KENSLER, T. W. Targeting NRF2 signaling for cancer chemoprevention. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2010, **244**(1), 66-76.
- LAMBERT, J. D. & ELIAS, R. J. The antioxidant and pro-oxidant activities of green tea polyphenols: a role in cancer prevention. *Arch Biochem Biophys*, 2010, **501**(1), 65-72.
- LAMBERT, J. D., KENNETT, M. J., SANG, S., REUHL, K. R., JU, J. & YANG, C. S. Hepatotoxicity of high oral dose (-)-epigallocatechin-3-gallate in mice. *Food Chem Toxicol*, 2010, **48**(1), 409-416.
- LEE, M. J., MALIAKAL, P., CHEN, L., MENG, X., BONDOC, F. Y., PRABHU, S., LAMBERT, G., MOHR, S. & YANG, C. S. Pharmacokinetics of tea catechins after ingestion of green tea and (-)-epigallocatechin-3-gallate by humans: formation of different metabolites and individual variability. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2002, **11**(10 Pt 1), 1025-1032.
- LEWIS, K. N., MELE, J., HAYES, J. D. & BUFFENSTEIN, R. Nrf2, a guardian of healthspan and gatekeeper of species longevity. *Integr Comp Biol*, 2010, **50**(5), 829-843.
- LIANG, Y. C., LIN-SHIAU, S. Y., CHEN, C. F. & LIN, J. K. Inhibition of cyclin-dependent kinases 2 and 4 activities as well as induction of Cdk inhibitors p21 and p27 during growth arrest of human breast carcinoma cells by (-)-epigallocatechin-3-gallate. *J Cell Biochem*, 1999, **75**(1), 1-12.
- LIU, D., LI, C., CHEN, Y., BURNETT, C., LIU, X. Y., DOWNS, S., COLLINS, R. D. & HAWIGER, J. Nuclear import of proinflammatory transcription factors is required for massive liver apoptosis induced by bacterial lipopolysaccharide. *J Biol Chem*, 2004, **279**(46), 48434-48442.
- LIU, J., WU, K. C., LU, Y. F., EKUASE, E. & KLAASSEN, C. D. Nrf2 protection against liver injury produced by various hepatotoxicants. *Oxid Med Cell Longev*, 2013, **2013**305861.
- LIU, P., VONDERFECHT, S. L., MCGUIRE, G. M., FISHER, M. A., FARHOOD, A. & JAESCHKE, H. The 21-aminosteroid tirilazad mesylate protects against endotoxin shock and acute liver failure in rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 1994, **271**(1), 438-445.
- LIU, Y. X., JIN, L. M., ZHOU, L., XIE, H. Y., JIANG, G. P., CHEN, H. & ZHENG, S. S. Sirolimus attenuates reduced-size liver ischemia-reperfusion injury but impairs liver regeneration in rats. *Dig Dis Sci*, 2010, **55**(8), 2255-2262.
- MA, Z. C., HONG, Q., WANG, Y. G., LIANG, Q. D., TAN, H. L., XIAO, C. R., TANG, X. L., SHAO, S., ZHOU, S. S. & GAO, Y. Ferulic acid induces heme oxygenase-1 via activation of ERK and Nrf2. *Drug Discov Ther*, 2011, **5**(6), 299-305.

- MA, Z. C., HONG, Q., WANG, Y. G., TAN, H. L., XIAO, C. R., LIANG, Q. D., ZHANG, B. L. & GAO, Y. Ferulic Acid Protects Human Umbilical Vein Endothelial Cells from Radiation Induced Oxidative Stress by Phosphatidylinositol 3-Kinase and Extracellular Signal-Regulated Kinase Pathways. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 2010, **33**(1), 29-34.
- MAIESE, K., CHONG, Z. Z., HOU, J. & SHANG, Y. C. Oxidative stress: Biomarkers and novel therapeutic pathways. *Exp Gerontol*, 2010, **45**(3), 217-234.
- MANSOURI, A., GAOU, I., DE KERGUENEC, C., AMSELLEM, S., HAOUZI, D., BERSON, A., MOREAU, A., FELDMANN, G., LETTERON, P., PESSAYRE, D. & FROMENTY, B. An alcoholic binge causes massive degradation of hepatic mitochondrial DNA in mice. *Gastroenterology*, 1999, **117**(1), 181-190.
- MATSUMARU, K., JI, C. & KAPLOWITZ, N. Mechanisms for sensitization to TNF-induced apoptosis by acute glutathione depletion in murine hepatocytes. *Hepatology*, 2003, **37**(6), 1425-1434.
- MAZZANTI, G., MENNITI-IPPOLITO, F., MORO, P. A., CASSETTI, F., RASCHETTI, R., SANTUCCIO, C. & MASTRANGELO, S. Hepatotoxicity from green tea: a review of the literature and two unpublished cases. *Eur J Clin Pharmacol*, 2009, **65**(4), 331-341.
- MEAKIN, P. J., CHOWDHRY, S., SHARMA, R. S., ASHFORD, F. B., WALSH, S. V., MCCRIMMON, R. J., DINKOVA-KOSTOVA, A. T., DILLON, J. F., HAYES, J. D. & ASHFORD, M. L. J. Susceptibility of Nrf2-Null Mice to Steatohepatitis and Cirrhosis upon Consumption of a High-Fat Diet Is Associated with Oxidative Stress, Perturbation of the Unfolded Protein Response, and Disturbance in the Expression of Metabolic Enzymes but Not with Insulin Resistance. *Molecular and Cellular Biology*, 2014, **34**(17), 3305-3320.
- MELOV, S., RAVENSCROFT, J., MALIK, S., GILL, M. S., WALKER, D. W., CLAYTON, P. E., WALLACE, D. C., MALFROY, B., DOCTROW, S. R. & LITHGOW, G. J. Extension of lifespan with superoxide dismutase/catalase mimetics. *Science*, 2000, **289**(5484), 1567-1569.
- MERELES, D. & HUNSTEIN, W. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) for clinical trials: more pitfalls than promises? *Int J Mol Sci*, 2011, **12**(9), 5592-5603.
- MERRILL, C. L., NI, H., YOON, L. W., TIRMEINSTEIN, M. A., NARAYANAN, P., BENAVIDES, G. R., EASTON, M. J., CREECH, D. R., HU, C. X., MCFARLAND, D. C., HAHN, L. M., THOMAS, H. C. & MORGAN, K. T. Etomoxir-induced oxidative stress in HepG2 cells detected by differential gene expression is confirmed biochemically. *Toxicol Sci*, 2002, **68**(1), 93-101.
- MICHAEL, S. L., PUMFORD, N. R., MAYEUX, P. R., NIESMAN, M. R. & HINSON, J. A. Pretreatment of mice with macrophage inactivators decreases acetaminophen hepatotoxicity and the formation of reactive oxygen and nitrogen species. *Hepatology*, 1999, **30**(1), 186-195.
- MICHALOPOULOS, G. K. Liver regeneration. *J Cell Physiol*, 2007, **213**(2), 286-300.
- MICHALOPOULOS, G. K. Liver regeneration after partial hepatectomy: critical analysis of mechanistic dilemmas. *Am J Pathol*, 2010, **176**(1), 2-13.
- MICHALOPOULOS, G. K. Advances in liver regeneration. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 2014, **8**(8), 897-907.
- MICHALOPOULOS, G. K. & DEFRANCES, M. C. Liver Regeneration. *Science*, 1997, **276**(5309), 60-66.
- MLADENKA, P., ZATLOUKALOVA, L., FILIPSKY, T. & HRDINA, R. Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. *Free Radic Biol Med*, 2010, **49**(6), 963-975.
- MOBASHER, M. A., GONZALEZ-RODRIGUEZ, A., SANTAMARIA, B., RAMOS, S., MARTIN, M. A., GOYA, L., RADA, P., LETZIG, L., JAMES, L. P., CUADRADO, A., MARTIN-PEREZ, J., SIMPSON, K. J., MUNTANE, J. & VALVERDE, A. M. Protein tyrosine phosphatase 1B modulates GSK3 $\beta$ /Nrf2 and IGFIR signaling pathways in acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Cell Death Dis*, 2013, **4**e626.
- MOLINARI, M., WATT, K. D., KRUSZYNA, T., NELSON, R., WALSH, M., HUANG, W. Y., NASHAN, B. & PELTEKIAN, K. Acute liver failure induced by green tea extracts: case report and review of the literature. *Liver Transpl*, 2006, **12**(12), 1892-1895.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 1983, **65**(1-2), 55-63.

- MURATA, H., YAGI, T., IWAGAKI, H., OGINO, T., SADAMORI, H., MATSUKAWA, H., UMEDA, Y., HAGA, S., TAKAKA, N. & OZAKI, M. Mechanism of impaired regeneration of fatty liver in mouse partial hepatectomy model. *J Gastroenterol Hepatol*, 2007, **22**(12), 2173-2180.
- MURRAY, A. B., STRECKER, W. & SILZ, S. Ultrastructural changes in rat hepatocytes after partial hepatectomy, and comparison with biochemical results. *J Cell Sci*, 1981, **50**433-448.
- MUZOLF-PANEK, M., GLISZCZYNSKA-SWIGLO, A., DE HAAN, L., AARTS, J. M., SZYMUSIAK, H., VERVOORT, J. M., TYRAKOWSKA, B. & RIETJENS, I. M. Role of catechin quinones in the induction of EpRE-mediated gene expression. *Chem Res Toxicol*, 2008, **21**(12), 2352-2360.
- NAGAI, H., MATSUMARU, K., FENG, G. & KAPLOWITZ, N. Reduced glutathione depletion causes necrosis and sensitization to tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced apoptosis in cultured mouse hepatocytes. *Hepatology*, 2002, **36**(1), 55-64.
- NAVARRO, V. J., BONKOVSKY, H. L., HWANG, S. I., VEGA, M., BARNHART, H. & SERRANO, J. Catechins in dietary supplements and hepatotoxicity. *Dig Dis Sci*, 2013, **58**(9), 2682-2690.
- NI, H.-M., WOOLBRIGHT, B. L., WILLIAMS, J., COPPLE, B., CUI, W., LUYENDYK, J. P., JAESCHKE, H. & DING, W.-X. Nrf2 promotes the development of fibrosis and tumorigenesis in mice with defective hepatic autophagy. *Journal of Hepatology*, 2014, **61**(3), 617-625.
- NI, H. M., BOCKUS, A., BOGGESE, N., JAESCHKE, H. & DING, W. X. Activation of autophagy protects against acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Hepatology*, 2012a, **55**(1), 222-232.
- NI, H. M., BOGGESE, N., MCGILL, M. R., LEBOSKY, M., BORUDE, P., APTE, U., JAESCHKE, H. & DING, W. X. Liver-specific loss of Atg5 causes persistent activation of Nrf2 and protects against acetaminophen-induced liver injury. *Toxicol Sci*, 2012b, **127**(2), 438-450.
- NI, H. M., BOGGESE, N., MCGILL, M. R., LEBOSKY, M., BORUDE, P., APTE, U., JAESCHKE, H. & DING, W. X. Liver-Specific Loss of Atg5 Causes Persistent Activation of Nrf2 and Protects Against Acetaminophen-Induced Liver Injury. *Toxicological Sciences*, 2012c, **127**(2), 438-450.
- NIDDK (2014) *DRUG RECORD - GREEN TEA (CAMELLIA SINESIS)* [online]. In: LiverTox - Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury. National Institute of Diabetes & Digestive & Kidney Diseases. c2010, poslední revize 4.11.2014 [cit.2015-01-23]. Dostupné z <http://livertox.nlm.nih.gov/GreenTea.htm>
- NIEMINEN, A. L., SAYLOR, A. K., TESFAI, S. A., HERMAN, B. & LEMASTERS, J. J. Contribution of the mitochondrial permeability transition to lethal injury after exposure of hepatocytes to t-butylhydroperoxide. *Biochem J*, 1995, **307** ( Pt 1)99-106.
- NISHINAKA, T., ICHIO, Y., ITO, M., KIMURA, M., KATSUYAMA, M., IWATA, K., MIURA, T., TERADA, T. & YABE-NISHIMURA, C. Curcumin activates human glutathione S-transferase P1 expression through antioxidant response element. *Toxicol Lett*, 2007, **170**(3), 238-247.
- OHKAWA, H., OHISHI, N. & YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*, 1979, **95**(2), 351-358.
- PALLOTTINI, V., MARTINI, C., BASSI, A. M., ROMANO, P., NANNI, G. & TRENTALANCE, A. Rat HMGCoA reductase activation in thioacetamide-induced liver injury is related to an increased reactive oxygen species content. *J Hepatol*, 2006, **44**(2), 368-374.
- PARK, J. H., JIN, J. Y., BAEK, W. K., PARK, S. H., SUNG, H. Y., KIM, Y. K., LEE, J. & SONG, D. K. Ambivalent role of gallated catechins in glucose tolerance in humans: a novel insight into non-absorbable gallated catechin-derived inhibitors of glucose absorption. *J Physiol Pharmacol*, 2009, **60**(4), 101-109.
- PFAFFL, M. W., HORGAN, G. W. & DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res*, 2002, **30**(9), e36.
- PIERCE, R. H., CAMPBELL, J. S., STEPHENSON, A. B., FRANKLIN, C. C., CHAISSON, M., POOT, M., KAVANAGH, T. J., RABINOVITCH, P. S. & FAUSTO, N. Disruption of redox homeostasis in tumor necrosis factor-induced apoptosis in a murine hepatocyte cell line. *Am J Pathol*, 2000, **157**(1), 221-236.

- REISMAN, S. A., BUCKLEY, D. B., TANAKA, Y. & KLAASSEN, C. D. CDDO-Im protects from acetaminophen hepatotoxicity through induction of Nrf2-dependent genes. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2009a, **236**(1), 109-114.
- REISMAN, S. A., CSANAKY, I. L., ALEKSUNES, L. M. & KLAASSEN, C. D. Altered disposition of acetaminophen in Nrf2-null and Keap1-knockdown mice. *Toxicol Sci*, 2009b, **109**(1), 31-40.
- RONCO, M. T., DEALVAREZ, M. L., MONTI, J., CARRILLO, M. C., PISANI, G., LUGANO, M. C. & CARNOVALE, C. E. Modulation of balance between apoptosis and proliferation by lipid peroxidation (LPO) during rat liver regeneration. *Mol Med*, 2002, **8**(12), 808-817.
- ROUSAR, T., KUCERA, O., LOTKOVA, H. & CERVINKOVA, Z. Assessment of reduced glutathione: comparison of an optimized fluorometric assay with enzymatic recycling method. *Anal Biochem*, 2012a, **423**(2), 236-240.
- ROUSAR, T., NYDLOVA, E., CESLA, P., STANKOVA, P., KUCERA, O., PARIK, P. & CERVINKOVA, Z. Purified acetaminophen-glutathione conjugate is able to induce oxidative stress in rat liver mitochondria. *Physiol Res*, 2012b, **61 Suppl 2**S103-109.
- ROY, A. M., BALIGA, M. S. & KATIIYAR, S. K. Epigallocatechin-3-gallate induces apoptosis in estrogen receptor-negative human breast carcinoma cells via modulation in protein expression of p53 and Bax and caspase-3 activation. *Mol Cancer Ther*, 2005, **4**(1), 81-90.
- RYCHTRMOC, D., HUBALKOVA, L., VISOVA, A., LIBRA, A., BUNCEK, M. & CERVINKOVA, Z. Transcriptome temporal and functional analysis of liver regeneration termination. *Physiol Res*, 2012, **61 Suppl 2**S77-92.
- SAHIN, K., TUZCU, M., GENCOGLU, H., DOGUKAN, A., TIMURKAN, M., SAHIN, N., ASLAN, A. & KUCUK, O. Epigallocatechin-3-gallate activates Nrf2/HO-1 signaling pathway in cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Life Sci*, 2010, **87**(7-8), 240-245.
- SAITO, Y., MORI, H., TAKASU, C., KOMATSU, M., HANAOKA, J., YAMADA, S., ASANOMA, M., IKEMOTO, T., IMURA, S., MORINE, Y., UTSUNOMIYA, T. & SHIMADA, M. Beneficial effects of green tea catechin on massive hepatectomy model in rats. *Journal of Gastroenterology*, 2014, **49**(4), 692-701.
- SEABRA, A. L., SAVASSI-ROCHA, P. R., VASCONCELOS, A. C., LIMA, A. S., RODRIGUES, K. C. & ALMEIDA, H. M. Ischemia/reperfusion injury after continuous or intermittent hepatic pedicle clamping in rabbits. *Arq Bras Cir Dig*, 2012, **25**(2), 105-109.
- SEEHOFER, D., SCHIRMEIER, A., BENGMARK, S., CHO, S. Y., KOCH, M., LEDERER, A., RAYES, N., MENDER, M. D., NEUHAUS, P. & NUSSLER, A. K. Curcumin attenuates oxidative stress and inflammatory response in the early phase after partial hepatectomy with simultaneous intraabdominal infection in rats. *J Surg Res*, 2010, **159**(1), 497-502.
- SEIFRTOVA, M., HAVELEK, R., CMIELOVA, J., JIROUTOVA, A., SOUKUP, T., BRUCKOVA, L., MOKRY, J., ENGLISH, D. & REZACOVA, M. The response of human ectomesenchymal dental pulp stem cells to cisplatin treatment. *Int Endod J*, 2012, **45**(5), 401-412.
- SELZNER, M. & CLAVIEN, P. A. Failure of regeneration of the steatotic rat liver: disruption at two different levels in the regeneration pathway. *Hepatology*, 2000, **31**(1), 35-42.
- SHANKAR, S., SUTHAKAR, G. & SRIVASTAVA, R. K. Epigallocatechin-3-gallate inhibits cell cycle and induces apoptosis in pancreatic cancer. *Front Biosci*, 2007, **12**S039-5051.
- SHEN, G., XU, C., HU, R., JAIN, M. R., NAIR, S., LIN, W., YANG, C. S., CHAN, J. Y. & KONG, A. N. Comparison of (-)-epigallocatechin-3-gallate elicited liver and small intestine gene expression profiles between C57BL/6J mice and C57BL/6J/Nrf2 (-/-) mice. *Pharm Res*, 2005, **22**(11), 1805-1820.
- SHIM, M. & SAAB, S. Severe hepatotoxicity due to Hydroxycut: a case report. *Dig Dis Sci*, 2009, **54**(2), 406-408.
- SCHONTHAL, A. H. Adverse effects of concentrated green tea extracts. *Mol Nutr Food Res*, 2011, **55**(6), 874-885.
- SINGH, B. N., SHANKAR, S. & SRIVASTAVA, R. K. Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): mechanisms, perspectives and clinical applications. *Biochem Pharmacol*, 2011, **82**(12), 1807-1821.



- SMITH, D. M., WANG, Z., KAZI, A., LI, L. H., CHAN, T. H. & DOU, Q. P. Synthetic analogs of green tea polyphenols as proteasome inhibitors. *Mol Med*, 2002, **8**(7), 382-392.
- SRIVIDHYA, R., ZARKOVIC, K., STROSER, M., WAEG, G., ZARKOVIC, N. & KALAISELVI, P. Mitochondrial alterations in aging rat brain: effective role of (-)-epigallo catechin gallate. *Int J Dev Neurosci*, 2009, **27**(3), 223-231.
- STANKOVA, P., KUCERA, O., LOTKOVA, H., ROUSAR, T., ENDLICHER, R. & CERVINKOVA, Z. The toxic effect of thioacetamide on rat liver in vitro. *Toxicol In Vitro*, 2010, **24**(8), 2097-2103.
- STRONG, R., MILLER, R. A., ASTLE, C. M., BAUR, J. A., DE CABO, R., FERNANDEZ, E., GUO, W., JAVORS, M., KIRKLAND, J. L., NELSON, J. F., SINCLAIR, D. A., TETER, B., WILLIAMS, D., ZAVERI, N., NADON, N. L. & HARRISON, D. E. Evaluation of resveratrol, green tea extract, curcumin, oxaloacetic acid, and medium-chain triglyceride oil on life span of genetically heterogeneous mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2013, **68**(1), 6-16.
- SURH, Y. J., KUNDU, J. K. & NA, H. K. Nrf2 as a master redox switch in turning on the cellular signaling involved in the induction of cytoprotective genes by some chemopreventive phytochemicals. *Planta Med*, 2008, **74**(13), 1526-1539.
- TANAKA, Y., ALEKSUNES, L. M., YEAGER, R. L., GYAMFI, M. A., ESTERLY, N., GUO, G. L. & KLAASSEN, C. D. NF-E2-related factor 2 inhibits lipid accumulation and oxidative stress in mice fed a high-fat diet. *J Pharmacol Exp Ther*, 2008, **325**(2), 655-664.
- TANNURI, A. C. A., TANNURI, U., COELHO, M. C., SANTOS, N. A. D. & MELLO, E. S. D. Experimental models of hepatectomy and liver regeneration using newborn and weaning rats. *Clinics*, 2007, **62**757-762.
- TARANTINO, G., SCOPACASA, F., COLAO, A., CAPONE, D., TARANTINO, M., GRIMALDI, E. & SAVASTANO, S. Serum Bcl-2 concentrations in overweight-obese subjects with nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*, 2011, **17**(48), 5280-5288.
- THANGAPANDIYAN, S. & MILTONPRABU, S. Epigallocatechin gallate effectively ameliorates fluoride-induced oxidative stress and DNA damage in the liver of rats. *Can J Physiol Pharmacol*, 2013, **91**(7), 528-537.
- TIPOE, G. L., LEUNG, T. M., LIONG, E. C., LAU, T. Y., FUNG, M. L. & NANJI, A. A. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) reduces liver inflammation, oxidative stress and fibrosis in carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>)-induced liver injury in mice. *Toxicology*, 2010, **273**(1-3), 45-52.
- TZUNG, S. P., FAUSTO, N. & HOCKENBERY, D. M. Expression of Bcl-2 family during liver regeneration and identification of Bcl-x as a delayed early response gene. *Am J Pathol*, 1997, **150**(6), 1985-1995.
- ULLMANN, U., HALLER, J., DECOURT, J. P., GIRAULT, N., GIRAULT, J., RICHARD-CAUDRON, A. S., PINEAU, B. & WEBER, P. A single ascending dose study of epigallocatechin gallate in healthy volunteers. *J Int Med Res*, 2003, **31**(2), 88-101.
- UZUN, M. A., KOKSAL, N., KADIOGLU, H., GUNERHAN, Y., AKTAS, S., DURSUN, N. & SEHIRLI, A. O. Effects of N-acetylcysteine on regeneration following partial hepatectomy in rats with nonalcoholic fatty liver disease. *Surg Today*, 2009, **39**(7), 592-597.
- VENDEMIALE, G., GRATAGLIANO, I., CARACENI, P., CARACCIO, G., DOMENICALI, M., DALL'AGATA, M., TREVISANI, F., GUERRIERI, F., BERNARDI, M. & ALTOMARE, E. Mitochondrial oxidative injury and energy metabolism alteration in rat fatty liver: effect of the nutritional status. *Hepatology*, 2001, **33**(4), 808-815.
- VIDELA, L. A., RODRIGO, R., ORELLANA, M., FERNANDEZ, V., TAPIA, G., QUINONES, L., VARELA, N., CONTRERAS, J., LAZARTE, R., CSENDES, A., ROJAS, J., MALUENDA, F., BURDILES, P., DIAZ, J. C., SMOK, G., THIELEMANN, L. & PONIACHIK, J. Oxidative stress-related parameters in the liver of non-alcoholic fatty liver disease patients. *Clin Sci (Lond)*, 2004, **106**(3), 261-268.
- VOEHRINGER, D. W. BCL-2 and glutathione: alterations in cellular redox state that regulate apoptosis sensitivity. *Free Radic Biol Med*, 1999, **27**(9-10), 945-950.
- WALLACE, D. C. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu Rev Genet*, 2005, **39**359-407.

- WALSH, J. G., CULLEN, S. P., SHERIDAN, C., LUTHI, A. U., GERNER, C. & MARTIN, S. J. Executioner caspase-3 and caspase-7 are functionally distinct proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, **105**(35), 12815-12819.
- WANG, Y., MEI, Y., FENG, D. & XU, L. (-)-Epigallocatechin-3-gallate protects mice from concanavalin A-induced hepatitis through suppressing immune-mediated liver injury. *Clin Exp Immunol*, 2006, **145**(3), 485-492.
- WOLFRAM, S., RAEDERSTORFF, D., PRELLER, M., WANG, Y., TEIXEIRA, S. R., RIEGGER, C. & WEBER, P. Epigallocatechin gallate supplementation alleviates diabetes in rodents. *J Nutr*, 2006, **136**(10), 2512-2518.
- WU, C. C., HSU, M. C., HSIEH, C. W., LIN, J. B., LAI, P. H. & WUNG, B. S. Upregulation of heme oxygenase-1 by Epigallocatechin-3-gallate via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and ERK pathways. *Life Sci*, 2006, **78**(25), 2889-2897.
- WULLAERT, A., HEYNINCK, K. & BEYAERT, R. Mechanisms of crosstalk between TNF-induced NF-kappaB and JNK activation in hepatocytes. *Biochem Pharmacol*, 2006, **72**(9), 1090-1101.
- YAMADA, Y., KIRILLOVA, I., PESCHON, J. J. & FAUSTO, N. Initiation of liver growth by tumor necrosis factor: deficient liver regeneration in mice lacking type I tumor necrosis factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997, **94**(4), 1441-1446.
- YANG, C. S. & WANG, X. Green tea and cancer prevention. *Nutr Cancer*, 2010, **62**(7), 931-937.
- YANG, F., DE VILLIERS, W. J., MCCLAIN, C. J. & VARILEK, G. W. Green tea polyphenols block endotoxin-induced tumor necrosis factor-production and lethality in a murine model. *J Nutr*, 1998, **128**(12), 2334-2340.
- YANG, F., OZ, H. S., BARVE, S., DE VILLIERS, W. J., MCCLAIN, C. J. & VARILEK, G. W. The green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate blocks nuclear factor-kappa B activation by inhibiting I kappa B kinase activity in the intestinal epithelial cell line IEC-6. *Mol Pharmacol*, 2001, **60**(3), 528-533.
- YAO, X. M., ZHAO, J., LI, Y. & LI, Y. Effects of bicyclol on liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *Dig Dis Sci*, 2009, **54**(4), 774-781.
- YASUDA, Y., SHIMIZU, M., SAKAI, H., IWASA, J., KUBOTA, M., ADACHI, S., OSAWA, Y., TSURUMI, H., HARA, Y. & MORIWAKI, H. (-)-Epigallocatechin gallate prevents carbon tetrachloride-induced rat hepatic fibrosis by inhibiting the expression of the PDGFRbeta and IGF-1R. *Chem Biol Interact*, 2009, **182**(2-3), 159-164.
- YOO, N. J., KIM, H. R., KIM, Y. R., AN, C. H. & LEE, S. H. Somatic mutations of the KEAP1 gene in common solid cancers. *Histopathology*, 2012, **60**(6), 943-952.
- YU, C., LI, Y., HOLMES, A., SZAFRANSKI, K., FAULKES, C. G., COEN, C. W., BUFFENSTEIN, R., PLATZER, M., DE MAGALHAES, J. P. & CHURCH, G. M. RNA sequencing reveals differential expression of mitochondrial and oxidation reduction genes in the long-lived naked mole-rat when compared to mice. *PLoS One*, 2011, **6**(11), e26729.
- ZHANG, Y. K., YEAGER, R. L., TANAKA, Y. & KLAASSEN, C. D. Enhanced expression of Nrf2 in mice attenuates the fatty liver produced by a methionine- and choline-deficient diet. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2010, **245**(3), 326-334.
- ZHAO, G. J., CHEN, X., LI, X. L., YU, Y. J., HONG, G. L., QIU, Q. M., LI, M. F. & LU, Z. Q. [Functional polymorphism of NRF2 gene promoter -617C/A in lipopolysaccharide-stimulated peripheral blood mononuclear cellular inflammatory response in patients with alcoholic liver disease]. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi*, 2013, **52**(7), 581-584.

# Epigallocatechin Gallate Does Not Accelerate the Early Phase of Liver Regeneration After Partial Hepatectomy in Rats

Vojtěch Mezera · Otto Kučera · Alena Moravcová ·  
Eva Peterová · Zuzana Červinková

Received: 1 July 2013 / Accepted: 15 November 2013 / Published online: 8 December 2013  
© The Author(s) 2013. This article is published with open access at Springerlink.com

## Abstract

**Background** Two-thirds partial hepatectomy (PHx) is an established model for the study of liver regeneration after resection. This process is accompanied by oxidative stress.

**Aims** In our study, we tested the effect of epigallocatechin gallate (EGCG), a green tea antioxidant, on the early phase of liver regeneration after PHx.

**Methods** Male Wistar rats were divided into five groups: (I) laparotomy + water for intraperitoneal injections, (II) laparotomy + EGCG 50 mg/kg body weight, (III) PHx + water for injections, (IV) PHx + EGCG 20 mg/kg and (V) PHx + EGCG 50 mg/kg, for 3 consecutive days. The rats were killed 24 h after surgery. Biochemical analysis of rat sera was performed. Histological samples were stained with hematoxylin & eosin and bromodeoxyuridine (BrdU). In hepatectomized rats, we also measured plasma malondialdehyde, tissue malondialdehyde, glutathione and cytokines levels, the activity of caspases 3/7, expression of

Nqo-1 and HO-1 genes at the mRNA level, and expression of p21, p-p27 and p-p53 genes at the protein level.

**Results** We observed lower accumulation of BrdU in group V when compared to groups III and IV. The activity of caspases 3/7 and expression of p-p53 were lower in group V than in groups III and IV. Tissue levels of IL-6 were lower in group V when compared to group III. Significant differences were not noted in other parameters.

**Conclusions** Administration of EGCG did not stimulate early phase liver regeneration in rats after PHx. There was even lower DNA synthesis in the group treated with a high dose of EGCG.

**Keywords** Antioxidants · Epigallocatechin gallate · Hepatectomy · Liver regeneration · Oxidative stress

## Abbreviations

AI	Water for injections
ALT	Alanine aminotransferase
ALP	Alkaline phosphatase
AST	Aspartate aminotransferase
BrdU	5-Bromo-2-deoxyuridine
EGCG	Epigallocatechin gallate
EGCG20	Epigallocatechin gallate 20 mg/kg body weight
EGCG50	Epigallocatechin gallate 50 mg/kg body weight
GSH	Glutathione (reduced form)
GSSG	Glutathione (oxidized form)
HO-1	Heme oxygenase-1
HRR	Hepatic regeneration rate [25]
IL-6	Interleukin-6
LAP	Laparotomy
LRR	Liver regeneration rate [26]
MDA	Malondialdehyde

V. Mezera (✉) · O. Kučera · A. Moravcová · Z. Červinková  
Department of Physiology, Faculty of Medicine in Hradec  
Kralove, Charles University in Prague, Simkova 870,  
500 38 Hradec Kralove 1, Czech Republic  
e-mail: mezev5ar@lfhk.cuni.cz

O. Kučera  
e-mail: kucerao@lfhk.cuni.cz

A. Moravcová  
e-mail: moravca2@lfhk.cuni.cz

Z. Červinková  
e-mail: wolff@lfhk.cuni.cz

E. Peterová  
Department of Biochemistry, Faculty of Medicine in Hradec  
Kralove, Charles University in Prague, Hradec Kralove 1, Czech  
Republic  
e-mail: peterovae@lfhk.cuni.cz

Nqo-1	NAD(P)H-quinone-oxidoreductase
Nrf2-2	NF-E2-related factor 2
PHx	Two-thirds partial hepatectomy
TGF- $\beta$ 1	Transforming growth factor beta1
TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor alpha

## Introduction

Liver resection is a surgical procedure performed for a variety of malignant and benign focal liver lesions. It is one of the few methods that gives the patient a chance for complete recovery. This is in both primary liver tumors, especially hepatocellular carcinoma [1], and secondary tumors, notably liver metastases from colorectal carcinoma [2].

Vascular occlusion, used during liver resection to prevent hemorrhage, causes ischemia–reperfusion injury. Reperfusion of the liver enhances cell injury by oxidative stress and an inflammatory reaction [3]. In addition, liver regeneration itself was found to be a state of increased oxidative stress [4, 5]. Some surgical procedures for preventing the ischemia–reperfusion injury have already found their way into clinical practice [3], whereas possible pharmacological approaches remain limited. This is because no decrease in mortality, incidence of liver failure or perioperative morbidity was found [6]. Two-thirds partial hepatectomy (PHx), carried out on small laboratory animals, is a well-established model for studying of liver regeneration [7].

Excessive oxidative stress observed in mice after knockout of a key transcription factor for endogenous antioxidative enzymes led to significant diminution of liver regeneration after PHx [8]. This transcription factor, NF-E2-related factor 2 (Nrf2), is an upstream regulator of various antioxidative proteins and xenobiotic-metabolizing enzymes, particularly glutathione-*S*-transferase, NAD(P)H-quinone-oxidoreductase (Nqo-1), superoxide-dismutase, glutathione-peroxidase, heme oxygenase-1 (HO-1), catalase and others [8–10].

Protection against oxidative stress may enhance liver regeneration after resection, as shown in a study using vitamins C and E [11]. Aside from these directly acting antioxidants, which after oxidation can act as pro-oxidants, indirect antioxidants exist. These are able to activate the aforementioned transcription factor Nrf2 and subsequently many cytoprotective proteins [9, 10]. The indirectly acting antioxidants have very low prooxidative effects [12].

One of these is (–)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG), a polyphenolic antioxidant from green tea. Besides this effect, EGCG also acts as a direct antioxidant because of

the presence of phenolic groups that are sensitive to oxidation and can generate quinone [9, 13]. EGCG is the most abundant of the green tea catechins [14]. Its protective role was found in a model of acute toxic liver injury [15], chronic toxic liver injury [16, 17], non-alcoholic steatosis and steatohepatitis [18–20], and hepatic ischemia–reperfusion injury [18, 21]. EGCG was also able to ameliorate experimental diabetes mellitus by downregulation of genes for gluconeogenesis and synthesis of fatty acids, triacylglycerols and cholesterol [22, 23]. The effect of EGCG on liver regeneration after PHx has not been tested yet.

In our study, we tested the effect of EGCG in the early phase of liver regeneration after PHx in rats. Since the highest rate of DNA synthesis is in hepatocytes 24 h after PHx [24], we decided to investigate the regenerative response in this particular interval. We also focused on the monitoring of possible changes in relevant signaling pathways.

## Methods

### Chemicals

Unless otherwise stated, BrdU (5-bromo-2-deoxyuridine) and other chemicals used were all of analytical grade and had been purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). The kit for determination of caspase 3/7 activities was obtained from Promega (Madison, WI, USA). Mouse monoclonal anti-BrdU antibody had been obtained from DAKO (Glostrup, Denmark) and secondary anti-mouse antibody from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA, USA).

Mouse anti- $\beta$ -actin antibodies and rabbit anti-p21 CIP1 were purchased from Sigma-Aldrich, rabbit p27 Kip1 and rabbit phospho-p53 (Ser15) from Cell Signaling (Beverly, MA, USA), mouse Bcl-2 antibody (C-2) from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA), secondary goat anti-rabbit IgG from Sigma-Aldrich and secondary goat anti-mouse IgG from Santa Cruz Biotechnology.

### Experimental Design

Male Wistar rats (BioTest, Konárovice, Czech Republic) with initial weight of  $248 \pm 13$  g were used throughout the study. The rats were housed at  $23 \pm 1$  °C,  $55 \pm 10$  % humidity, air exchange 12–14 times/h and 12 h light–dark cycles. The animals had free access to tap water and were fed the standard pelleted diet ST-1 ad libitum (Velas, Lysá nad Labem, Czech Republic). In accordance with Czech legislation, all animals received care according to the guidelines set out by the Institutional Animal Use and Care

Committee of the Faculty of Medicine of Hradec Králové, and this committee approved our study.

The animals were selected for laparotomy (LAP, sham operation) or 2/3 partial hepatectomy (PHx) under ether anesthesia [7]. Water for injections (AI) or EGCG in a dose of 20 or 50 mg/kg body weight was administered intraperitoneally for 3 consecutive days (regimen according to [15]), with the third dose administered immediately after the operation. The animals were divided into following five groups:

I—AI + LAP: water for injections and laparotomy,  $n = 6$ ;

II—EGCG50 + LAP: EGCG 50 mg/kg and laparotomy,  $n = 6$ ;

III—AI + PHx: water for injections and PHx,  $n = 6$ ;

IV—EGCG20 + PHx: EGCG 20 mg/kg and PHx,  $n = 6$ ;

V—EGCG50 + PHx: EGCG 50 mg/kg and PHx,  $n = 6$ .

The animals were killed under general anesthesia by exsanguination 24 h after the operation, i.e., on the 4th day of the experiment. BrdU for detection of DNA synthesis was administered at a dose of 50 mg/kg intraperitoneally 1 h before sacrificing. Blood and liver samples were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analysis. Resected liver from the 3rd day and the remnant on the 4th day were weighed and liver growth was calculated according to formulas from the literature [25, 26].

#### Serum Biochemical Measurements

Serum concentrations of glucose, total and conjugated bilirubin, activities of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and alkaline phosphatase (ALP) of all animals were measured in the Department of Clinical Biochemistry and Diagnostics, University Hospital in Hradec Králové. In the hepatectomized groups (groups III, IV, V), plasmatic levels of malondialdehyde (MDA) were also measured.

#### Determination of GSH and GSSG

After adding the liver homogenate to cold 10 % metaphosphoric acid, mixing and centrifuging ( $20,000\times g$ , 10 min.,  $4^{\circ}\text{C}$ ), glutathione in the supernatant was analyzed by Hissin's fluorimetric method [27] modified by Roušar [28]. Briefly, GSH was exposed to orthophthalaldehyde in hydrogenphosphate buffer, and the fluorimetric detection was carried out ( $\lambda_{\text{Ex}} = 340\text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{Em}} = 420\text{ nm}$ ). GSSG was assessed after alkaline hydrolysis in the same way as GSH.

#### Determination of Liver Tissue Cytokines and TBARS

The protein content in the sample was determined after homogenization in RIPA buffer and spinning ( $10,000\times g$ ) by the Bradford method [29] using bovine serum albumin as a standard. Afterwards, levels of liver TNF- $\alpha$  in the supernatant were measured using the ELISA method. Rat TNF-alpha Platinum ELISA, Rat IL-1 beta Platinum ELISA and Rat TGF-beta1 Platinum ELISA kits were purchased from eBioscience (San Diego, CA, USA).

Lipid peroxidation in liver supernatants from the homogenates was determined according to Ohkawa et al. [30], i.e., by the assessment of thio barbituric acid reactive substances (TBARS).

#### Determination of Caspase-3/7 Activity in Liver Homogenate

Activity of executive caspases was measured using the Caspase-Glo<sup>TM</sup> 3/7 kit. Briefly, after homogenization according to Liu et al. [31], the tissues were centrifuged and samples adjusted to contain the same amount of protein [29]. The samples were incubated for 1 and 2 h with Caspase-Glo<sup>TM</sup> reagent (contains substrate for caspases 3/7), and the emitted luminescence was measured using the TECAN Infinite M200.

#### Determination of p21, p-p27, p-p53, and Bcl-2 Expression

Expression of p21, p-p27 and p-p53 genes at the protein level was estimated using the Western blot method as described previously [32]. After homogenization [31] and quantification of protein content [29], the lysates containing an equal amount of protein (10  $\mu\text{g}$ ) were subjected to SDS-PAGE using gradient gel NuPAGE<sup>®</sup> Novex<sup>®</sup> Bis-Tris Mini gels 4–12 % (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and transferred to a cellulose nitrate membrane (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). The membranes were incubated with primary rabbit antibodies at  $4^{\circ}\text{C}$  overnight and with secondary antibody goat anti-rabbit IgG for 2 h. Proteins were visualized using a chemiluminescence detection kit (Roche, Penzberg, Germany) and autoradiographic film (Foma, Hradec Kralove, Czech Republic). To confirm equal protein loading, each membrane was reprobed and reincubated to detect  $\beta$ -actin. The preparation differed for Bcl-2 protein, where we used a more concentrated homogenate of liver tissue in RIPA buffer.

#### Determination of HO-1 and Nqo-1 Gene Expression

Gene expression was examined as previously described [33], with the exception that total RNA from liver tissue was isolated by phenol–chloroform extraction using the



RNA Blue kit (TOP-Bio, Prague, Czech Republic). TaqMan Fast Universal PCR Master Mix and pre-designed TaqMan Gene Expression Assay kits were from Life Technologies (Carlsbad, CA, USA), and primers and probe were purchased from Generi Biotech (Hradec Králové, Czech Republic). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase was used as reference for normalizing the data.

#### Liver Histology, Incorporation of Bromodeoxyuridine

After the rats had been killed, liver samples were immediately fixed by immersion in 4 % neutral formaldehyde. Paraffin sections were stained with hematoxylin & eosin and checked for the presence of steatosis and/or inflammation. Furthermore, apoptosis was assessed according to [34], i.e., the number of apoptotic bodies per visual field was calculated in hematoxylin & eosin-stained samples. The pathologist evaluating the samples was blinded to the study.

The immunohistochemical analysis was made on paraffin sections of the liver tissue as described previously [35]. Briefly, the paraffin sections were incubated with primary mouse anti-BrdU monoclonal antibody, then with biotinylated anti-mouse secondary antibody and subsequently with a streptavidin conjugate of peroxidase (Dako, Glostrup, Denmark). Visualization of bound antibody was performed using 3,3'-diaminobenzidine-tetrahydrochloride and hydrogen peroxide. BrdU incorporation was determined by counting of positively stained hepatocyte nuclei in nine representative microscope fields ( $\times 100$  magnification) using an Olympus IX51 microscope and quantified using a computer-aided image analysis system NIS-Elements AR 2.30 (Nikon, Lewisville, TX, USA).

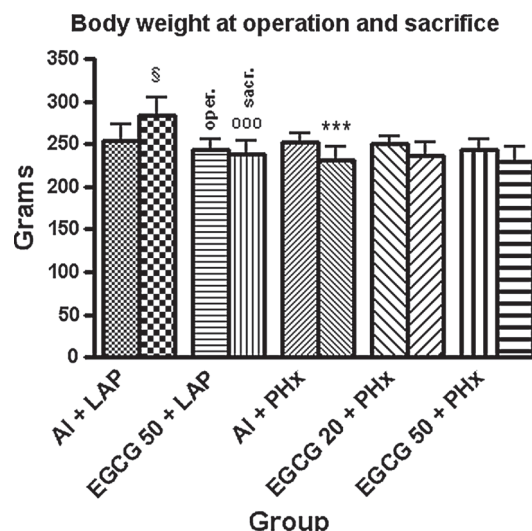
#### Statistical Analysis

The results are expressed as the mean  $\pm$  SD. Analyses were performed using Graph-Pad Prism 4.03 software (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA). First, normality was tested by Kolmogorov-Smirnov test. In normal data, comparisons were made among the groups using ANOVA followed by Tukey-Kramer's post hoc test. In the case of non-Gaussian distribution, non-parametric Kruskal-Wallis tests and Dunn's post hoc test were used.  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

## Results

#### Animals, Body and Liver Weight

During our experiment all animals survived until the sacrifice. One animal from the EGCG50 + PHx group had a surgical complication (hemoperitoneum) and was excluded



**Fig. 1** Body weight of experimental animals at operation (day 1) and at sacrifice (day 2). §, §§, §§§ When comparing the same group at sacrifice and at operation. °, °°, °°° When comparing the EGCG50 + LAP group with the AI + LAP group; \*, \*\*, \*\*\* when compared to laparotomized animals (AI + PHx vs. AI + LAP; EGCG20 + PHx vs. EGCG50 + LAP; EGCG50 + PHx vs. EGCG50 + LAP),  $p < 0.05$ ;  $p < 0.01$ ;  $p < 0.001$ , respectively

**Table 1** Indices of liver regeneration

	AI + PHx	EGCG 20 + PHx	EGCG 50 + PHx	<i>p</i> value
HRR (%)	9.5 $\pm$ 4	13.5 $\pm$ 6	8.9 $\pm$ 10	ns
LRR (%)	23.3 $\pm$ 8	29.9 $\pm$ 9	18.1 $\pm$ 25	ns

HRR (%) =  $(C - (A - B))/A \times 100$  (Murata [26])

LRR (%) =  $(C - (A - B))/C \times 100$  (Selzner [25])

A estimated total liver weight at PHx, B excised liver weight, C weight of regenerated liver at sacrifice

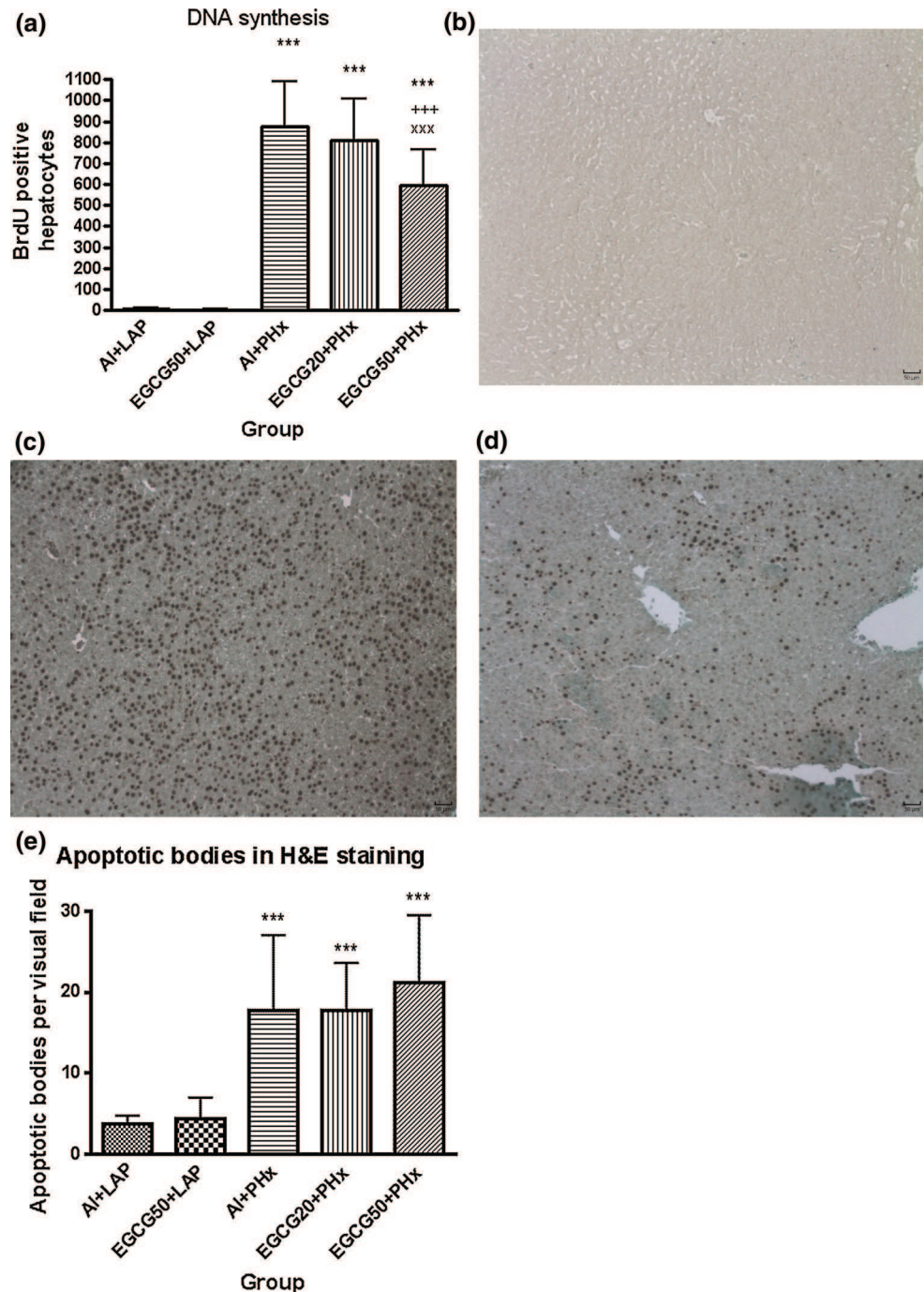
from further analysis. In group I (AI + LAP) the body weight rose after the operation ( $p < 0.05$ ); in all other groups, there was a non-significant trend to decline in body weight after the operation. Body weight at operation did not differ among groups; however, body weight was higher at sacrifice in the AI + LAP group when compared to the EGCG50 + LAP and AI + PHx groups ( $p < 0.001$ ) (Fig. 1).

Among hepatectomized groups (III, IV, V), the calculated indices of liver regeneration appeared highest in the EGCG20 + PHx group; however, due to high variability the differences were not statistically significant (Table 1).

#### Histological Findings, Incorporation of BrdU

In hematoxylin & eosin staining from the caudate lobe, distinct lipid accumulation was visible in the hepatectomized groups (III, IV, V); this is consistent with published

**Fig. 2 a** DNA synthesis estimated by BrdU incorporation. \*, \*\*, \*\*\* When compared to laparotomized animals (AI + PHx vs. AI + LAP; EGCG20 + PHx vs. EGCG50 + LAP; EGCG50 + PHx vs. EGCG50 + LAP); +, ++, +++ when compared to the AI + PHx group; ×, ××, ××× when compared to the EGCG20 + PHx group,  $p < 0.05$ ;  $p < 0.01$ ;  $p < 0.001$ , respectively. **b** Laparotomized groups: only sporadic BrdU-positive cells. **c** Group III (AI + PHx): numerous BrdU-positive cells. **d** Group V (EGCG50 + PHx): numerous BrdU-positive cells, but less than in groups III and IV. Note that the positive nuclei are mostly in periportal areas. **e** Apoptotic bodies. \*, \*\*, \*\*\* When compared to laparotomized animals (AI + PHx vs. AI + LAP; EGCG20 + PHx vs. EGCG50 + LAP; EGCG50 + PHx vs. EGCG50 + LAP)



data [36]. In addition, there was vacuolation of the cytoplasm in peripherally located hepatocytes in the hepatectomized groups and sporadically occurring pyknotic nuclei. In the center of the lobe, sparse hepatocytes with granular eosinophilic cytoplasm occurred. We did not observe signs of pronounced inflammatory infiltration in any of the rats. The number of apoptotic bodies was significantly higher in the hepatectomized groups (III, IV, V) compared to the laparotomized groups (I, II). The apoptotic bodies were mostly noticed around the central veins. The laparotomized

groups did not differ from one another in apoptotic body count; we did not observe differences among the hepatectomized animals either (Fig. 2e).

Immunohistochemical staining for incorporated BrdU showed only sporadic positive hepatocytes in the laparotomized groups (I, II); there was high positivity in the hepatectomized groups (III, IV, V). We observed no difference between groups III and IV; however, the count of BrdU-positive cells in the EGCG50 + PHx group was lower when compared to the AI + PHx and

**Table 2** Serum biochemistry

	AI + LAP	EGCG 50 + LAP	AI + PHx	EGCG 20 + PHx	EGCG 50 + PHx	<i>p</i> value
Glycemia (mmol/l)	7.01 ± 0.61	10.49 ± 0.28°	7.97 ± 0.57	8.9 ± 0.69*	8.71 ± 0.75*	<0.001
ALT (μkat/l)	1.01 ± 0.57	0.64 ± 0.06	4.08 ± 4.76	2.7 ± 1.38**	5.44 ± 4.95**	<0.01
AST (μkat/l)	3.2 ± 1.99	1.89 ± 0.37	7.05 ± 6.34	6.33 ± 2.57**	9.92 ± 8.20**	<0.01
ALP (μkat/l)	2.4 ± 0.45	2.57 ± 0.32	7.08 ± 1.11***	6.8 ± 1.29***	6.61 ± 1.39***	<0.001
Bilirubin total (μmol/l)	2.0 ± 0.0	3.0 ± 0.0	4.0 ± 1.55*	3.5 ± 0.55	5.6 ± 2.19	<0.05
Bilirubin conj. (μmol/l)	1.83 ± 0.41	2.0 ± 0.0	2.6 ± 0.89	2.17 ± 0.41	4.2 ± 2.28*	<0.05

°, °°, °°°When comparing the EGCG50 + LAP with the AI + LAP group

\*, \*\*, \*\*\* When compared to laparotomized animals (AI + PHx vs. AI + LAP; EGCG20 + PHx vs. EGCG50 + LAP; EGCG50 + PHx vs. EGCG50 + LAP), *p* < 0.05; *p* < 0.01; *p* < 0.001, respectively

EGCG20 + PHx groups (*p* < 0.001 for both comparisons) (Fig. 2a–d). BrdU positivity and thus DNA synthesis were noticed mostly in the periportal areas (Fig. 2c–d).

### Serum Biochemical Characteristics

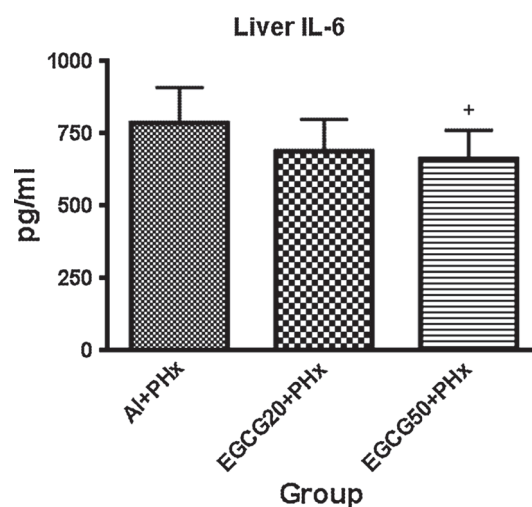
Serum glycemia was higher in group II (EGCG50 + LAP) when compared to group I (AI + LAP). There was a trend towards hyperglycemia even at a dose of 20 mg/kg when comparing group IV (EGCG20 + PHx) with group III (AI + PHx). In addition, we observed lower glycemia in the hepatectomized groups treated with EGCG when compared to the EGCG50 + LAP group.

Alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase activity was higher in hepatectomized animals, but the statistical significance was present only when comparing EGCG20 + PHx and EGCG50 + PHx with EGCG50 + LAP. Furthermore, the ALT and AST activity was somewhat lower in the EGCG20 + PHx than in the AI + PHx group, but this difference did not reach statistical significance. Alkaline phosphatase activity was higher in all hepatectomized groups when compared to the laparotomized groups.

Total bilirubin was higher in the EGCG50 + LAP group than in the AI + LAP group, and in the hepatectomized than in the laparotomized groups; however, a significant difference was observed only when comparing the AI + PHx with the AI + LAP groups. Conjugated bilirubin was higher in the hepatectomized than in the laparotomized groups, reaching significance only when comparing the EGCG50 + PHx with the EGCG50 + LAP group. Both total and conjugated bilirubin reached their highest values in the EGCG50 + PHx group; however, the differences among hepatectomized groups were not statistically significant (Table 2).

### Tissue Cytokines TNF-α, IL-6, and TGF-β: Markers of Oxidative Stress

We observed an insignificant trend of lower TNF-α in hepatectomized groups treated with EGCG when compared



**Fig. 3** Tissue levels of IL-6. +, ++, +++When compared to the AI + PHx group, *p* < 0.05; *p* < 0.01; *p* < 0.001, respectively

to the AI + PHx group. A similar trend was observed with IL-6, and its expression was significantly lower in the EGCG50 + PHx group when compared to the AI + PHx group (Fig. 3). We did not observe differences in the expression of liver TGF-β1.

A similar non-significant trend of lower tissue MDA, GSH and GSSG content as well as lower plasmatic MDA was observed in the EGCG20 + PHx group when compared to the AI + PHx and EGCG50 + PHx groups; however, none of these reached the level of statistical significance (Table 3).

### Nqo-1 and HO-1 Gene Expression at the mRNA Level

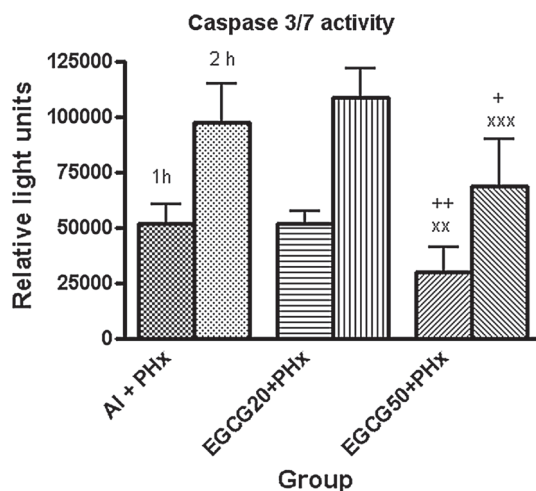
There were no significant differences among hepatectomized groups in mRNA expression of Nqo-1 and HO-1. Because of the small amount of measured samples in experimental groups (*n* = 3), we observed only an insignificant trend of lower HO-1 expression in EGCG20 + PHx and higher HO-1 expression in the



**Table 3** Cytokines TNF- $\alpha$ , IL-6 and TGF- $\beta$ : markers of oxidative stress

	AI + PHx	EGCG 20 + PHx	EGCG 50 + PHx	<i>p</i> value
Plasmatic MDA ( $\mu\text{mol/l}$ )	1.20 $\pm$ 0.18	1.07 $\pm$ 0.18	1.24 $\pm$ 0.14	ns
Tissue MDA (nmol/mg protein)	0.35 $\pm$ 0.20	0.27 $\pm$ 0.07	0.47 $\pm$ 0.13	ns
Tissue GSH ( $\mu\text{mol/l}$ )	810 $\pm$ 195	717 $\pm$ 164	781 $\pm$ 144	ns
Tissue GSSG ( $\mu\text{mol/l}$ )	238 $\pm$ 169	188 $\pm$ 140	241 $\pm$ 164	ns
Tissue TNF- $\alpha$ (pg/ml)	803 $\pm$ 103	771 $\pm$ 69	752 $\pm$ 126	ns
Tissue IL-6 (pg/ml)	785 $\pm$ 122	686 $\pm$ 111	660 $\pm$ 99 <sup>+</sup>	<0.05
Tissue TGF- $\beta$ 1 (pg/ml)	8,024 $\pm$ 4,775	6,340 $\pm$ 4,053	7,647 $\pm$ 4,651	ns

+, ++, +++ When comparing the EGCG50 + PHx with the AI + PHx group,  $p < 0.05$ ;  $p < 0.01$ ;  $p < 0.001$ , respectively



**Fig. 4** Activity of executive caspases 3/7; incubation for 1 and 2 h, respectively. +, ++, +++ When compared to the AI + PHx group; ×, ××, ××× when compared to the EGCG20 + PHx group,  $p < 0.05$ ;  $p < 0.01$ ;  $p < 0.001$ , respectively

EGCG50 + PHx group when compared to the AI + PHx group (not shown).

#### Activity of Caspases 3/7

After 1 h incubation, lower activity in the EGCG50 + PHx group was observed when compared to the AI + PHx and EGCG20 + PHx groups ( $p < 0.01$  for both comparisons). After 2 h incubation, the EGCG50 + PHx group also had lower activity compared to both the AI + PHx ( $p < 0.05$ ) and EGCG20 + PHx ( $p < 0.001$ ) groups (Fig. 4).

#### Protein Expression of Cell-Cycle Regulating Proteins

Protein expression of p21 and p-p27 did not differ among hepatectomized groups. On the other hand, expression of p-p53 protein appeared higher in group IV (EGCG20 + PHx) and lower in group V (EGCG50 + PHx) than in group III (AI + PHx) (Fig. 5). We were not able to detect Bcl-2 protein.

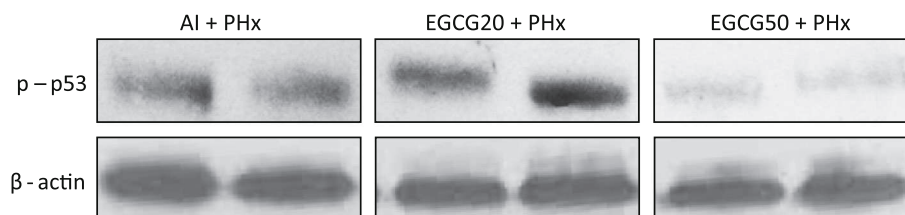
#### Discussion

Despite several studies describing the beneficial effect of EGCG on the liver in various experimental models, there was no beneficial effect on liver regeneration after PHx in our experiment. There was even lower DNA synthesis in animals receiving higher doses of EGCG. Based on our results, the use of EGCG in conditions of organ alteration, such as regenerating liver, cannot be recommended. The effect of EGCG is complex: several hundred EGCG-regulated genes were identified in a study with microarrays [37]. Furthermore, anti-proliferative and -cancer properties of EGCG are known [38, 39].

Since EGCG was reported to decrease the production of TNF- $\alpha$  [40] and IL-6 [38], which plays an important role in liver regeneration [41, 42], we wondered if the inhibiting effect of EGCG on DNA synthesis was mediated in this way. There was only a non-significant trend of lower TNF- $\alpha$  levels in EGCG-treated hepatectomized animals when compared to hepatectomized animals receiving water for injections. A possible explanation is that TNF- $\alpha$  is involved in regulation of even earlier events in liver regeneration [24]. Similarly, the levels of IL-6 were lower in the EGCG50 + PHx group compared to the AI + PHx group.

Furthermore, EGCG was repeatedly reported to activate caspases and increase apoptosis [43–46]. Surprisingly, we found rather lower activity of executive caspases 3/7 in liver homogenates from group V (EGCG50 + PHx) than from animals receiving a lower dose (EGCG20 + PHx) or vehicle only (AI + PHx). An explanation could be the different effects of EGCG on tumor and normal cells: EGCG was shown to protect hepatocytes from apoptosis caused by toxic injury [47, 48]. Direct inhibition of caspase 3 by EGCG was also described [49]. We were not able to detect the Bcl-2 protein using Western blot. However, we are not the first workplace to fail to do so: Tzung et al. [50] reported undetectable levels of Bcl-2 mRNA and protein at 24 h after PHx. Our results of apoptotic body count are also in accord with [50], since the authors showed a peak of

**Fig. 5** Western blot bands of p-p53 protein with beta-actin as a loading control (p21 and p-p27 are not shown as no differences were observed)



high proapoptotic Bad and rather lower expression of antiapoptotic Bcl-x at 24 h after PHx.

Other antiproliferative mechanisms of EGCG are changes in cell-cycle regulating proteins, especially induction of cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p27 [43, 51, 52], and increased expression and serine phosphorylation of p53 [45, 53]. However, we were not able to prove a difference in p21 and p27 expression among hepatectomized groups. Expressions of phosphorylated p53 appeared higher in the EGCG20 + PHx group and surprisingly lower in hepatectomized animals receiving a higher dose of EGCG (EGCG50 + PHx) when compared to the group receiving vehicle (AI + PHx).

Many more antiproliferative mechanisms of EGCG were described, changes in protein kinases, growth factors and transcription factors [38], e.g., inhibition of NF-KB [54].

To check whether the Nrf2 pathway had been activated, we measured the expression of HO-1 and Nqo-1 genes, which belong to Nrf2 effectors, at the mRNA level [55, 56]. However, due to the small number of samples, we were not able to prove activation of this pathway.

Interestingly, EGCG led to higher glycemia compared to vehicle-treated rats, which is in contrary to other findings [22, 23]. It should be mentioned that orally administered EGCG decreases glucose absorption from the intestine, but parenterally administered EGCG hinders glucose uptake into the tissues [57].

Although some antioxidants accelerated liver regeneration after PHx, as could be seen in a study with vitamin C and E [11], and a study with bicyclol [58], other antioxidants and hepatoprotective agents revealed a rather inhibitory effect on liver regeneration after PHx, namely resveratrol [59], curcumin [60] and *S*-adenosylmethionin [61]. Considering the often complex effect of natural antioxidants on cells, the diversity of the results is not surprising. Similarly, the immunosuppressant sirolimus was able to attenuate ischemia–reperfusion injury, but impaired liver regeneration after PHx [62].

Not only our results, but also other studies suggest that EGCG should be used with caution. EGCG is present in over-the-counter extracts from green tea [63, 64] and even in other herbal dietary supplements that do not indicate content of catechins [65]. These supplements are not without a risk—there were repeatedly reported cases of acute liver injury

caused by green tea extracts [66–68]. Although these injuries can be partly explained by toxicity of other substances in the supplements (especially caffeine and/or undetected contaminants), EGCG itself also revealed important effects, particularly interaction with other drugs [69, 70] and a pro-oxidant effect at high doses [67, 71]. In mice, the dose of 120 mg/kg administered intraperitoneally was hepatotoxic and the dose 150 mg/kg lethal for all mice [71]; the dose of 1,500 mg/kg via a gastric tube was lethal for 85 % of mice [64]. In rats, the dose of 2,000 mg/kg administered via a gastric tube was lethal. Recently, a cholestatic effect of EGCG was described [72]; higher levels of conjugated bilirubin (even though not significantly) in EGCG-treated animals in our study correspond to these findings.

In a study with healthy human volunteers, a single dose of 1,600 mg EGCG taken orally was found to be safe and well tolerated [73]. Potential application of EGCG in clinical studies is complicated by hardly predictable bio-availability [74].

In conclusion, administration of EGCG did not enhance the early phase of liver regeneration after PHx in rats. The higher dose even led to lower DNA synthesis. Although the tests carried out have failed to clarify the mechanism of this effect, it was probably mediated by some pathway other than p53.

**Acknowledgments** We would like to thank to Mr. Rajiv Mandalia, MD, for language review. Thanks to Miroslav Podhola, MD, PhD, for histopathological evaluation. Also thanks to Monika Pospisilova and Hana Lastuvkova for their help with PCR, and to Dr. Tomáš Roušar and Dr. René Endlicher for glutathione measurement. This work was supported by grants from Charles University in Prague, GA UK 668512, PRVOUK P37/02 and SVV-2013-266901.

**Conflict of interest** None.

**Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Noncommercial License which permits any noncommercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and the source are credited.

## References

1. Llovet JM, Di Bisceglie AM, Bruix J, et al. Panel of experts in HCC-design clinical Trials. Design and endpoints of clinical trials in hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 2008;21:698–711.

2. Bramhall SR, Gur U, Coldham C, et al. Liver resection for colorectal metastases. *Ann R Coll Surg Engl*. 2003;85:334–339.
3. Bahde R, Spiegel HU. Hepatic ischaemia–reperfusion injury from bench to bedside. *Br J Surg*. 2010;97:1461–1475.
4. Francés D, Ronco MT, Ochoa E, et al. Oxidative stress in primary culture hepatocytes isolated from partially hepatectomized rats. *Can J Physiol Pharmacol*. 2007;85:1047–1051.
5. Han SY, Chang EJ, Choi HJ, et al. Total antioxidant status and oxygen free radicals during hepatic regeneration. *Transpl Proc*. 2006;38:2214–2215.
6. Abu-Amara M, Gurusamy K, Hori S, Glantzounis G, Fuller B, Davidson BR. Systematic review of randomized controlled trials of pharmacological interventions to reduce ischaemia–reperfusion injury in elective liver resection with vascular occlusion. *HPB (Oxford)*. 2010;12:4–14.
7. Higgins GM, Anderson RM. Experimental pathology of the liver. I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol*. 1931;12:186–202.
8. Beyer TA, Xu W, Teupser D, et al. Impaired liver regeneration in Nrf2 knockout mice: role of ROS-mediated insulin/IGF-1 resistance. *EMBO J*. 2008;27:212–223.
9. Surh YJ, Kundu JK, Na HK. Nrf2 as a master redox switch in turning on the cellular signaling involved in the induction of cytoprotective genes by some chemopreventive phytochemicals. *Planta Med*. 2008;74:1526–1539. doi:10.1055/s-0028-1088302.
10. Jung KA, Kwak MK. The Nrf2 system as a potential target for the development of indirect antioxidants. *Molecules*. 2010;15:7266–7291.
11. Ronco MT, deAlvarez ML, Monti J, et al. Modulation of balance between apoptosis and proliferation by lipid peroxidation (LPO) during rat liver regeneration. *Mol Med*. 2002;8:808–817.
12. Dinkova-Kostova AT, Talalay P. Direct and indirect antioxidant properties of inducers of cytoprotective proteins. *Mol Nutr Food Res*. 2008;52:S128–S138.
13. Lambert JD, Elias RJ. The antioxidant and pro-oxidant activities of green tea polyphenols: a role in cancer prevention. *Arch Biochem Biophys*. 2010;501:65–72. doi:10.1016/j.abb.2010.06.013.
14. Chen C, Yu R, Owuor ED, Kong AN. Activation of antioxidant-response element (ARE), mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and caspases by major green tea polyphenol components during cell survival and death. *Arch Pharm Res*. 2000;23:605–612.
15. Chen JH, Tipoe GL, Liong EC, et al. Green tea polyphenols prevent toxin-induced hepatotoxicity in mice by down-regulating inducible nitric oxide-derived prooxidants. *Am J Clin Nutr*. 2004;80:742–751.
16. Yasuda Y, Shimizu M, Sakai H, et al. (–)-Epigallocatechin gallate prevents carbon tetrachloride-induced rat hepatic fibrosis by inhibiting the expression of the PDGFR $\beta$  and IGF-1R. *Chem Biol Interact*. 2009;10:159–164.
17. Tipoe GL, Leung TM, Liong EC, Lau TY, Fung ML, Nanji AA. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) reduces liver inflammation, oxidative stress and fibrosis in carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>) induced liver injury in mice. *Toxicology*. 2010;29:45–52.
18. Fiorini RN, Donovan JL, Rodwell D, et al. Short-term administration of (–)-epigallocatechin gallate reduces hepatic steatosis and protects against warm hepatic ischemia/reperfusion injury in steatotic mice. *Liver Transpl*. 2005;11:298–308.
19. Kuzu N, Bahcecioglu IH, Dagli AF, Ozercan IH, Ustündag B, Sahin K. Epigallocatechin gallate attenuates experimental non-alcoholic steatohepatitis induced by high fat diet. *J Gastroenterol Hepatol*. 2008;23:e465–e470.
20. Chung MY, Park HJ, Manautou JE, Koo SI, Bruno RS. Green tea extract protects against nonalcoholic steatohepatitis in ob/ob mice by decreasing oxidative and nitrate stress responses induced by proinflammatory enzymes. *J Nutr Biochem*. 2012;23:361–367. doi:10.1016/j.jnutbio.2011.01.001.
21. Giakoustidis DE, Giakoustidis AE, Iliadis S, et al. Attenuation of liver ischemia/reperfusion induced apoptosis by epigallocatechin-3-gallate via down-regulation of NF-kappaB and c-Jun expression. *J Surg Res*. 2010;159:720–728.
22. Wolfram S, Raederstorff D, Preller M, et al. Epigallocatechin gallate supplementation alleviates diabetes in rodents. *J Nutr*. 2006;136:2512–2518.
23. Collins QF, Liu HY, Pi J, Liu Z, Quon MJ, Cao W. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG), a green tea polyphenol, suppresses hepatic gluconeogenesis through 5'-AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem*. 2007;282:30143–30149.
24. Michalopoulos GK. Liver regeneration. *J Cell Physiol*. 2007;213:286–300.
25. Selzner M, Clavien PA. Failure of regeneration of the steatotic rat liver: disruption at two different levels in the regeneration pathway. *Hepatology*. 2000;31:35–42.
26. Murata H, Yagi T, Iwagaki H, et al. Mechanism of impaired regeneration of fatty liver in mouse partial hepatectomy model. *J Gastroenterol Hepatol*. 2007;22:2173–2180.
27. Hissin PJ, Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem*. 1976;74:214–226.
28. Roušar T, Kučera O, Lotková H, Cervinková Z. Assessment of reduced glutathione: comparison of an optimized fluorometric assay with enzymatic recycling method. *Anal Biochem*. 2012;423:236–240. doi:10.1016/j.ab.2012.01.030.
29. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248–254.
30. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*. 1979;95:351–358.
31. Liu D, Li C, Chen Y, et al. Nuclear import of proinflammatory transcription factors is required for massive liver apoptosis induced by bacterial lipopolysaccharide. *J Biol Chem*. 2004;279:48434–48442.
32. Seifrtová M, Havelek R, Cmielová J, et al. The response of human ectomesenchymal dental pulp stem cells to cisplatin treatment. *Int Endod J*. 2012;45:401–412. doi:10.1111/j.1365-2591.2011.01990.x.
33. Hirsova P, Kolouchova G, Dolezelova E, et al. Epigallocatechin gallate enhances biliary cholesterol secretion in healthy rats and lowers plasma and liver cholesterol in ethinylestradiol-treated rats. *Eur J Pharmacol*. 2012;691:38–45. doi:10.1016/j.ejphar.2012.06.034.
34. Seabra AL, Savassi-Rocha PR, Vasconcelos AC, Lima AS, Rodrigues KC, Almeida HM. Ischemia/reperfusion injury after continuous or intermittent hepatic pedicle clamping in rabbits. *Arq Bras Cir Dig*. 2012;25:105–109.
35. Bader A, Pavlica S, Deiwick A, et al. Proteomic analysis to display the effect of low doses of erythropoietin on rat liver regeneration. *Life Sci*. 2011;89:827–833. doi:10.1016/j.lfs.2011.08.002.
36. Murray AB, Strecker W, Silz S. Ultrastructural changes in rat hepatocytes after partial hepatectomy, and comparison with biochemical results. *J Cell Sci*. 1981;50:433–448.
37. Shen G, Xu C, Hu R, et al. Comparison of (–)-epigallocatechin-3-gallate elicited liver and small intestine gene expression profiles between C57BL/6 J mice and C57BL/6 J/Nrf2 (–/–) mice. *Pharm Res*. 2005;22:1805–1820.
38. Singh BN, Shankar S, Srivastava RK. Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): mechanisms, perspectives and clinical applications. *Biochem Pharmacol*. 2011;82:1807–1821. doi:10.1016/j.bcp.2011.07.093.

39. Yang CS, Wang X. Green tea and cancer prevention. *Nutr Cancer*. 2010;62:931–937. doi:[10.1080/01635581.2010.509536](https://doi.org/10.1080/01635581.2010.509536).
40. Yang F, de Villiers WJ, McClain CJ, Varilek GW. Green tea polyphenols block endotoxin-induced tumor necrosis factor-production and lethality in a murine model. *J Nutr*. 1998;128:2334–2340.
41. Yamada Y, Kirillova I, Peschon JJ, Fausto N. Initiation of liver growth by tumor necrosis factor: deficient liver regeneration in mice lacking type I tumor necrosis factor receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94:1441–1446.
42. Michalopoulos GK. Liver regeneration after partial hepatectomy: critical analysis of mechanistic dilemmas. *Am J Pathol*. 2010;176:2–13. doi:[10.2353/ajpath.2010.090675](https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.090675).
43. Smith DM, Wang Z, Kazi A, Li LH, Chan TH, Dou QP. Synthetic analogs of green tea polyphenols as proteasome inhibitors. *Mol Med*. 2002;8:382–392.
44. Gupta S, Hastak K, Afaq F, Ahmad N, Mukhtar H. Essential role of caspases in epigallocatechin-3-gallate-mediated inhibition of nuclear factor kappa B and induction of apoptosis. *Oncogene*. 2004;23:2507–2522.
45. Roy AM, Baliga MS, Katiyar SK. Epigallocatechin-3-gallate induces apoptosis in estrogen receptor-negative human breast carcinoma cells via modulation in protein expression of p53 and Bax and caspase-3 activation. *Mol Cancer Ther*. 2005;4:81–90.
46. Shankar S, Suthakar G, Srivastava RK. Epigallocatechin-3-gallate inhibits cell cycle and induces apoptosis in pancreatic cancer. *Front Biosci*. 2007;12:5039–5051.
47. Kagaya N, Tagawa Y, Nagashima H, Saijo R, Kawase M, Yagi K. Suppression of cytotoxin-induced cell death in isolated hepatocytes by tea catechins. *Eur J Pharmacol*. 2002;450:231–236.
48. Wang Y, Mei Y, Feng D, Xu L. (–)-Epigallocatechin-3-gallate protects mice from concanavalin A-induced hepatitis through suppressing immune-mediated liver injury. *Clin Exp Immunol*. 2006;145:485–492.
49. Katunuma N, Murata E, Le QT, Hayashi Y, Ohashi A. New apoptosis cascade mediated by lysosomal enzyme and its protection by epigallocatechin gallate. *Adv Enzyme Regul*. 2004;44:1–10.
50. Tzung SP, Fausto N, Hockenbery DM. Expression of Bcl-2 family during liver regeneration and identification of Bcl-x as a delayed early response gene. *Am J Pathol*. 1997;150:1985–1995.
51. Gupta S, Hussain T, Mukhtar H. Molecular pathway for (–)-epigallocatechin-3-gallate-induced cell cycle arrest and apoptosis of human prostate carcinoma cells. *Arch Biochem Biophys*. 2003;410:177–185.
52. Liang YC, Lin-Shiau SY, Chen CF, Lin JK. Inhibition of cyclin-dependent kinases 2 and 4 activities as well as induction of Cdk inhibitors p21 and p27 during growth arrest of human breast carcinoma cells by (–)-epigallocatechin-3-gallate. *J Cell Biochem*. 1999;75:1–12.
53. Hastak K, Gupta S, Ahmad N, Agarwal MK, Agarwal ML, Mukhtar H. Role of p53 and NF-kappaB in epigallocatechin-3-gallate-induced apoptosis of LNCaP cells. *Oncogene*. 2003;22:4851–4859.
54. Yang F, Oz HS, Barve S, de Villiers WJ, McClain CJ, Varilek GW. The green tea polyphenol (–)-epigallocatechin-3-gallate blocks nuclear factor-kappa B activation by inhibiting I kappa B kinase activity in the intestinal epithelial cell line IEC-6. *Mol Pharmacol*. 2001;60:528–533.
55. Wu CC, Hsu MC, Hsieh CW, Lin JB, Lai PH, Wung BS. Upregulation of heme oxygenase-1 by epigallocatechin-3-gallate via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and ERK pathways. *Life Sci*. 2006;78:2889–2897.
56. Sahin K, Tuzcu M, Gencoglu H, et al. Epigallocatechin-3-gallate activates Nrf2/HO-1 signaling pathway in cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Life Sci*. 2010;87:240–245. doi:[10.1016/j.lfs.2010.06.014](https://doi.org/10.1016/j.lfs.2010.06.014).
57. Park JH, Jin JY, Baek WK, et al. Ambivalent role of gallated catechins in glucose tolerance in humans: a novel insight into non-absorbable gallated catechin-derived inhibitors of glucose absorption. *J Physiol Pharmacol*. 2009;60:101–109.
58. Yao XM, Zhao J, Li Y, Li Y. Effects of bicyclol on liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *Dig Dis Sci*. 2009;54:774–781. doi:[10.1007/s10620-009-0715-6](https://doi.org/10.1007/s10620-009-0715-6).
59. Kirimlioglu H, Ecevit A, Yilmaz S, Kirimlioglu V, Karabulut AB. Effect of resveratrol and melatonin on oxidative stress enzymes, regeneration, and hepatocyte ultrastructure in rats subjected to 70% partial hepatectomy. *Transpl Proc*. 2008;40:285–289.
60. Seehofer D, Schirmeier A, Bengmark S, et al. Inhibitory effect of curcumin on early liver regeneration following partial hepatectomy in rats. *J Surg Res*. 2009;155:195–200.
61. Kohoutek L, Cervinková Z, Kucera O, et al. Effect of S-adenosylmethionine on liver regeneration induced by partial hepatectomy. *Gen Physiol Biophys*. 2010;29:72–78.
62. Liu YX, Jin LM, Zhou L. Sirolimus attenuates reduced-size liver ischemia–reperfusion injury but impairs liver regeneration in rats. *Dig Dis Sci*. 2010;55:2255–2262. doi:[10.1007/s10620-009-1002-2](https://doi.org/10.1007/s10620-009-1002-2).
63. Isbrucker RA, Edwards JA, Wolz E, Davidovich A, Bausch J. Safety studies on epigallocatechin gallate (EGCG) preparations. Part 2: dermal, acute and short-term toxicity studies. *Food Chem Toxicol*. 2006;44:636–650.
64. Lambert JD, Kennett MJ, Sang S, Reuhl KR, Ju J, Yang CS. Hepatotoxicity of high oral dose (–)-epigallocatechin-3-gallate in mice. *Food Chem Toxicol*. 2010;48:409–416. doi:[10.1016/j.fct.2009.10.030](https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.10.030).
65. Navarro VJ, Bonkovsky HL, Hwang SI, Vega M, Barnhart H, Serrano J. Catechins in dietary supplements and hepatotoxicity. *Dig Dis Sci*. 2013;58:2682–2690. doi:[10.1007/s10620-013-2687-9](https://doi.org/10.1007/s10620-013-2687-9).
66. Molinari M, Watt KD, Kruszyna T, et al. Acute liver failure induced by green tea extracts: case report and review of the literature. *Liver Transpl*. 2006;12:1892–1895.
67. Mazzanti G, Menniti-Ippolito F, Moro PA, et al. Hepatotoxicity from green tea: a review of the literature and two unpublished cases. *Eur J Clin Pharmacol*. 2009;65:331–341.
68. Chen GC, Ramanathan VS, Law D, et al. Acute liver injury induced by weight-loss herbal supplements. *World J Hepatol*. 2010;2:410–415.
69. Shim M, Saab S. Severe hepatotoxicity due to hydroxycut: a case report. *Dig Dis Sci*. 2009;54:406–408. doi:[10.1007/s10620-008-0353-4](https://doi.org/10.1007/s10620-008-0353-4).
70. Schönthal AH. Adverse effects of concentrated green tea extracts. *Mol Nutr Food Res*. 2011;55:874–885.
71. Galati G, Lin A, Sultan AM, O'Brien PJ. Cellular and in vivo hepatotoxicity caused by green tea phenolic acids and catechins. *Free Radic Biol Med*. 2006;40:570–580.
72. Hirsova P, Karlasova G, Dolezelova E, et al. Cholestatic effect of epigallocatechin gallate in rats is mediated via decreased expression of Mrp2. *Toxicology*. 2013;303:9–15. doi:[10.1016/j.tox.2012.10.018](https://doi.org/10.1016/j.tox.2012.10.018).
73. Ullmann U, Haller J, Decourt JP, et al. A single ascending dose study of epigallocatechin gallate in healthy volunteers. *J Int Med Res*. 2003;31:88–101.
74. Mereles D, Hunstein W. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) for clinical trials: more pitfalls than promises? *Int J Mol Sci*. 2011;12:5592–5603.



# The effect of epigallocatechin gallate on hepatocytes isolated from normal and partially hepatectomized rats

Vojtech Mezera, Otto Kucera, Alena Moravcova, Eva Peterova, and Zuzana Cervinkova

**Abstract:** Epigallocatechin gallate (EGCG) is an antioxidant found in green tea. In this study, male Wistar rats were subjected either to partial hepatectomy (PHx), or a sham operation (LAP). Twenty-four hours after surgery, hepatocytes were isolated and treated with various concentrations of EGCG for up to 72 h. We then measured markers of cell viability, oxidative stress, DNA synthesis, and caspase activity. Morphological criteria, cell viability tests, and albumin synthesis revealed toxicity starting at 10  $\mu\text{mol/L}$ . DNA synthesis was higher in hepatocytes isolated from rats after PHx and inhibited by EGCG. Furthermore, EGCG increased the activity of caspases 3 and 7, seen more in hepatocytes from PHx rats. In conclusion, EGCG at a concentration of 10  $\mu\text{mol/L}$  was toxic for hepatocytes isolated from both PHx and LAP rats.

**Key words:** antioxidants, apoptosis, catechin, epigallocatechin gallate, hepatectomy, hepatocytes, liver regeneration, oxidative stress, primary cell culture.

**Résumé :** L'épigallocatechine gallate (EGCG) est un antioxydant du thé vert. Dans notre présente étude, les hepatocytes des rats mâles Wistar ayant subi une hepatectomie partielle, ou une laparotomie ont été isolés 24 h après la chirurgie et traitées avec différentes concentrations d'EGCG pendant 72 h. Les marqueurs de viabilité cellulaire, le stress oxydatif, la synthèse de l'ADN et l'activité des caspases ont été mesuré. Des critères morphologiques, tests de viabilité cellulaire et de synthèse de l'albumine ont révélé une toxicité à partir de 10  $\mu\text{mol/L}$ . La synthèse de l'ADN a été plus élevé dans les hépatocytes isolés de rats après hepatectomie partielle et inhibée par l'EGCG. En outre, l'EGCG a augmenté l'activité de caspases 3 et 7 des hépatocytes de rats après hepatectomie. En conclusion, la concentration de l'EGCG de 10  $\mu\text{mol/L}$  était toxique pour les hépatocytes isolés de rat dans les deux cas, après hepatectomie partielle ou laparotomie.

**Mots-clés :** antioxydants, apoptose, catéchine, le gallate d'épigallocatechine, hépatectomie, hépatocytes, régénération du foie, stress oxydatif, culture cellulaire primaire.

## Introduction

Oxidative stress plays an important role both in the pathogenesis of various liver injuries, e.g., toxic injury (Thangapandiyan and Miltonprabu 2013), in non-alcoholic fatty liver disease (Kuzu et al. 2008; Tarantino et al. 2011), and in surgery-related events like ischemia-reperfusion injury (Fiorini et al. 2005) or regeneration after partial hepatectomy (PHx) (Frances et al. 2007).

Some of the oxidative stress-related conditions can be ameliorated with epigallocatechin gallate (EGCG), a green tea catechin with antioxidant properties (Fiorini et al. 2005; Kuzu et al. 2008; Thangapandiyan and Miltonprabu 2013). However, we have recently found that EGCG exhibited a rather inhibitory effect when administered to rats subjected to PHx (Mezera et al. 2014).

On the other hand, EGCG has numerous tumor suppressing effects (Singh et al. 2011; Abou El Naga et al. 2013). This might at least partly explain the inhibitory effect on liver regeneration after PHx. Furthermore, the toxic effect of high concentrations of EGCG on primary rat hepatocytes has also been reported (Galati et al. 2006).

To elucidate the influence of EGCG on regenerating liver, we tested its effect on hepatocytes isolated from rat liver after partial hepatectomy with sham-operated rats used as a control. Since we have observed signs of EGCG toxicity on rat hepatocytes in primary culture at concentrations above 10  $\mu\text{mol/L}$  after 24-hour

cultivation (unpublished data), we used concentrations ranging from 1 to 15  $\mu\text{mol/L}$  EGCG in this study.

## Materials and methods

### Chemicals

Unless otherwise stated, all chemicals were of analytical grade and purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA). Goat anti-DR5, mouse Bcl-2 antibody, secondary goat anti-rabbit, goat anti-mouse IgG, and donkey anti-goat antibodies were obtained from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Texas, USA). Mouse anti- $\beta$ -actin was purchased from Sigma-Aldrich, and rabbit phospho-p53 (Ser15) from Cell Signaling (Beverly, Massachusetts, USA).

### Animals

Male Wistar rats (initial weight  $237 \pm 35$  g) were obtained from Velas (Lysá nad Labem, Czech Republic). The rats were housed at  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $55\% \pm 10\%$  humidity, with air exchange 12–14 times/h, and a 12 h (light) – 12 h (dark) cycle. The animals had free access to tap water and were fed a standard ST-1 pelleted diet ad libitum (Velas). All animal care was in accordance with Czech legislation and with the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (ILAR 2001). The study was approved by the Institutional Animal Use and Care Committee of the Faculty of Medicine in Hradec Králové.

The rats were subjected either to 2/3 partial hepatectomy, following the methods reported by Higgins and Anderson (1931) or to

Received 19 February 2014. Accepted 11 April 2014.

V. Mezera, O. Kucera, A. Moravcova, and Z. Cervinkova. Department of Physiology, Faculty of Medicine in Hradec Králové, Charles University in Prague, Simkova 870, 500 38 Hradec Králové 1, Czech Republic.

E. Peterova. Department of Biochemistry, Faculty of Medicine in Hradec Králové, Charles University in Prague, Czech Republic.

**Corresponding author:** Vojtech Mezera (e-mail: [mezev5ar@lfhk.cuni.cz](mailto:mezev5ar@lfhk.cuni.cz)).

a sham operation, i.e., laparotomy (LAP). All operations were performed under ether anesthesia.

### Hepatocyte preparation

Hepatocytes were isolated by 2-step collagenase perfusion as described previously (Berry et al. 1991; Kucera et al. 2012). Briefly, after cannulation of the portal vein, the liver was first perfused with a calcium-free solution then with a solution containing collagenase. Next, the perfused liver was separated into a suspension of hepatocytes. The suspension was purified by filtration and repeated centrifugation.

Cell viability was determined with a trypan blue exclusion test; in all isolations, the viability of hepatocytes was higher than 90%. Cell density was counted using a Cellometer (Nexcelom Bioscience, Lawrence, Mass.). Then, the suspension was diluted with Williams E medium enriched with 6% fetal bovine serum (Merck-Millipore, Berlin, Germany), glutamine (2 mmol/L), penicillin (100 IU/mL), streptomycin (10 mg/mL), insulin (0.08 IU/mL), prednisolone (0.5 µg/mL), and glucagon (0.008 µg/mL) to the desired cell density:  $2 \times 10^5$  for most of the assays,  $6 \times 10^5$  for phase-contrast images,  $2 \times 10^6$  for protein expression measurements. After seeding on collagen-coated cultivating 6-well (1 mL per well), 24-well (0.3 mL), and 96-well (0.1 mL) NUNC plates (Thermo Scientific, Waltham, Mass.) for 3 h, the medium was removed and the serum-free Williams E medium with concentrations of EGCG ranging from 1 to 15 µmol/L was added. The cells were incubated at 37 °C in atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>.

### Morphological assessment

Native images of identical sites on the cultivating plates were taken at 400× magnification in phase contrast at 24, 48, and 72 h after isolation using an Olympus IX51 microscope (Center Valley, Pennsylvania, USA) as described previously (Kucera et al. 2012).

### Viability tests: WST-1, LDH leakage, and albumin synthesis

The activity of intracellular dehydrogenases was determined as described previously (Kucera et al. 2012). The media were removed and the WST-1 substrate (obtained from Roche, Penzberg, Germany) added to the cells. Absorbance was measured at time 0 and at 2 h using a TECAN Infinite M200 spectrophotometer (Tecan Group AG, Männedorf, Switzerland). The difference between these values was calculated and used for statistical analysis.

Lactate dehydrogenase (LDH) activity was measured in both the media and the cell lysate using a commercial kit from DiaSys (Holzheim, Germany). To lyse the cells, we collected the media, kept the cells for 10 min at -80 °C, added distilled water, and scraped the cells. The ratio of extracellular and total LDH was then calculated.

The albumin content released into the medium was detected using a Rat Albumin ELISA Quantitation kit from Bethyl Laboratories (Montgomery, Tex.).

### Markers of oxidative stress: DCFDA and malondialdehyde

The production of reactive oxygen species (ROS) was determined using the fluorescence probe dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFDA) obtained from Life Technologies (Carlsbad, California, USA). After removing the media, a substrate diluted in culture medium (1 µmol/L) was added. Following 60 min incubation at 37 °C, the substrate was removed and the plate was washed with the medium. After an additional 45 min, the emitted fluorescence was measured from the top of the well-plate using an excitation and emission wavelength of 485 and 535 nm, respectively.

The presence of malondialdehyde (MDA), a marker of lipid peroxidation, was determined by assessing the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in the medium (Ohkawa et al. 1979).

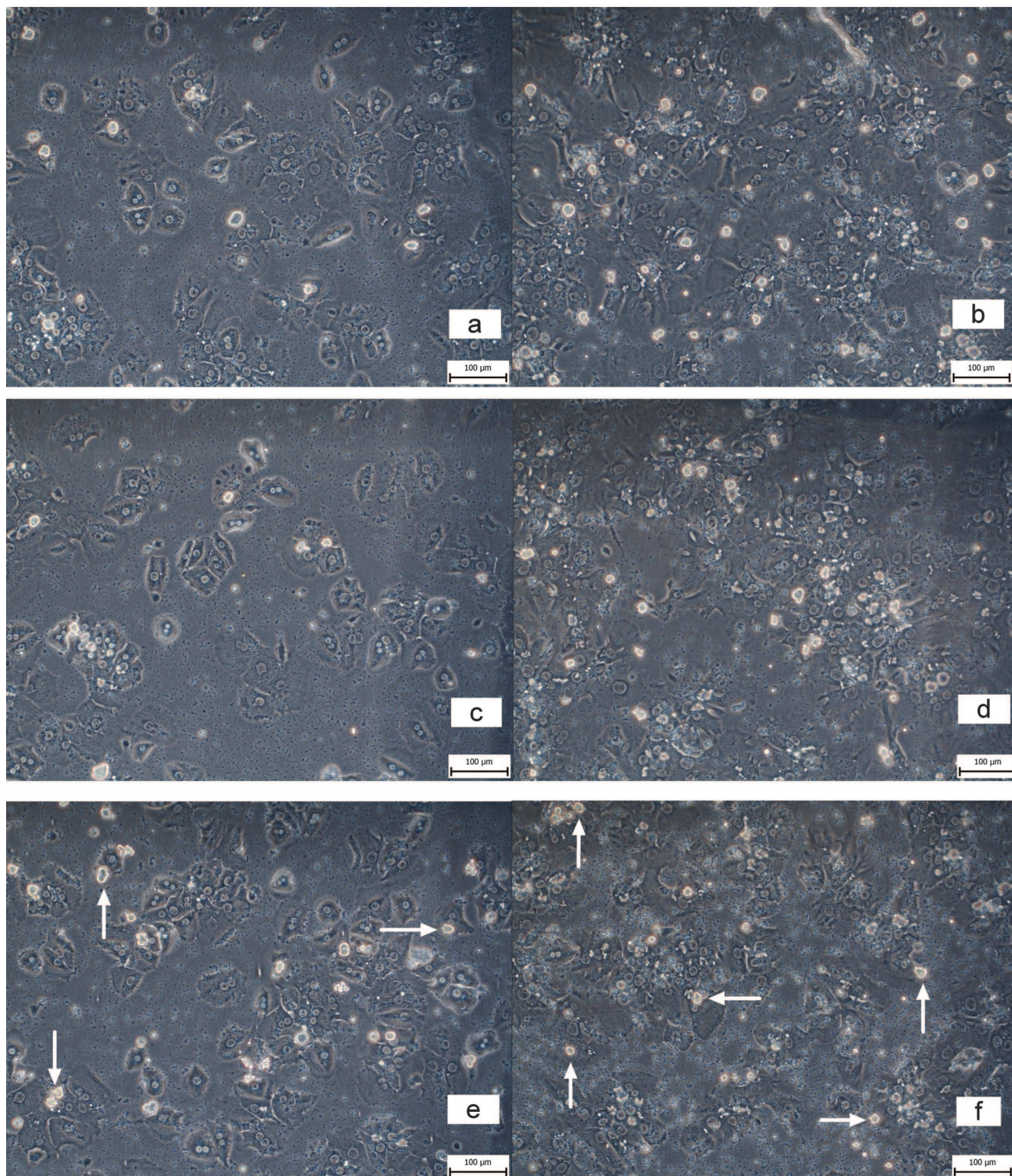
**Table 1.** WST-1 test (cellular dehydrogenase activity (% of LAP control)), LDH leakage (%), albumin in the medium (µg/mL), ROS formation (% of LAP control), levels of malondialdehyde (MDA) in the medium (µmol/L), DNA synthesis (% of background control).

	LAP + EGCG (µmol/L)					PHx + EGCG (µmol/L)				
	0	1	5	10	15	0	1	5	10	15
WST-1 test (n = 8)	100.0±13.2	120.5±25.6*	81.7±14.1	54.1±8.7***	44.7±4.8***	79.5±8.4†	85.9±8.5***	75.7±9.2	53.0±4.7††	40.4±2.0†††
LDH leakage (n = 6)	10.6±0.3	10.4±0.6	13.5±0.7	25.3±1.6***	25.3±2.0***	12.1±1.4	12.0±1.1	12.6±1.4	16.9±2.6†††***	16.7±2.4†††***
Albumin (n = 6)	7.01±0.62	7.26±0.33	5.18±0.45	2.37±0.18	1.95±0.07*	7.60±0.73	8.10±0.26	7.94±0.52	3.92±0.24	3.40±0.84
ROS (n = 8)	100±2	80±3***	96±4***	71±8***	58±3***	48±2***	42±1***	52±3***	71±3†††	65±3†††,‡
MDA (n = 6)	0.33±0.08	0.28±0.03	0.29±0.06	0.32±0.02	0.36±0.05	0.38±0.04	0.37±0.04	0.46±0.06***	0.50±0.08†††***	0.41±0.05
DNA synthesis (n = 6)	95.5±9.0	83.8±9.8	66.6±3.7	20.6±2.7	14.3±2.9*	126.8±9.9	126.3±4.1	95.1±5.2	62.0±1.9†	34.3±1.6††

Note: LAP, laparotomy (sham operated); LDH, lactate dehydrogenase; EGCG, epigallocatechin gallate; \*<sup>†††</sup> compared with the control LAP; †, ††, ††† compared with the control PHx; ‡, ‡†, ‡†† compared with the LAP+EGCG of the same concentration; p < 0.05, 0.01, 0.001 respectively.



**Fig. 1.** Microphotographs of hepatocytes from sham-operated (*a, c, e*) and hepatectomized rats (*b, d, f*) at 24 h after isolation: (*a* and *b*) hepatocytes treated with medium only; (*c* and *d*) hepatocytes treated with 1  $\mu\text{mol/L}$  epigallocatechin gallate (EGCG); (*e* and *f*) hepatocytes treated with 15  $\mu\text{mol/L}$  EGCG. Note the detached hepatocytes (arrows) and higher quantity of detritus between the cells in *e* and *f*. Phase contrast, magnification 400 $\times$ ; scale bar = 50  $\mu\text{m}$ .





### Caspase 3/7 activity

The activity of executioner caspases 3 and 7 was assessed using a Caspase Glo 3/7 kit obtained from Promega (Madison, Wisconsin, USA). The cells were exposed to Caspase Glo 3/7 reagent, which induced cell lysis and provided a substrate for caspases 3 and 7. The total luminescence at time 0, 60, and 120 min was measured, and the sum used for statistical analysis.

### DNA synthesis

To assess the rate of DNA synthesis, we used a BrdU Cell Proliferation ELISA Kit (colorimetric) obtained from Abcam (Cambridge, UK). The manufacturer's instructions were followed. Briefly, 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) was added to the media 24 h prior to harvesting the cells. Then the cells were fixed and exposed sequentially to a primary antibody, secondary antibody, and substrate for peroxidase; the cells were washed between the steps. The absorbance was measured at 450 nm.

### Protein expression of phospho-p53, Bcl-2, and DR5

After removing the media, cells were lysed in cell lysis buffer obtained from Cell Signaling Technology (Danvers, Mass.) and enriched with a cOmplete Mini protease inhibitor and a PhosSTOP phosphatase inhibitor, both of which were provided by Roche Applied Science. The protein content was assessed using the Bradford method. The samples were then adjusted to contain the same amount of protein (35 µg per lane) and subjected to SDS-PAGE using gradient gels NuPAGE, Novex, Bis-Tris Mini 4–12% (Life Technologies). Afterwards, the proteins were transferred to a cellulose nitrate membrane (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif.) and exposed to antibodies targeting the proteins phospho-p53 (p-p53), Bcl-2, and death receptor TRAILR2/DR5 (DR5). Then, the membranes were exposed to the respective secondary antibodies. Proteins were visualized using a chemiluminescence detection kit (Roche) and autoradiographic film (Foma, Hradec Králové, Czech Republic). To confirm equal protein loading, each membrane was reprobed and reincubated to detect β-actin.

### Statistical analysis

Values are the mean ± SD. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism 6.01 (La Jolla, Calif.). The values were first tested for normality by means of a Kolmogorov-Smirnov test. Data with Gaussian distribution were analyzed with ANOVA and Tukey's post-hoc test. Data with non-Gaussian distribution were analyzed with a Kruskal-Wallis test, while Dunn's post-hoc test was used for multiple comparisons. Values for  $p < 0.05$  were considered statistically significant.

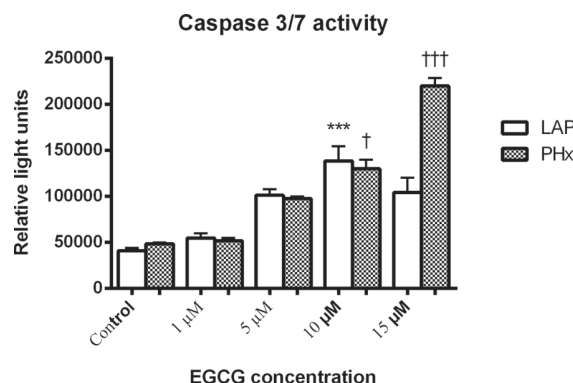
## Results

### Cell viability

As illustrated by the results of the WST-1 test, LDH leakage, and the albumin synthesis, EGCG in both the LAP and PHx groups displayed a toxic effect on hepatocytes, starting at a concentration of 10 µmol/L at 24 h after seeding. Interestingly, the LDH leakage was lower in hepatocytes from rats after PHx at concentrations of 10 µmol/L and 15 µmol/L. The concentration of 1 µmol/L exhibited, at least in the WST-1 test and albumin synthesis, a trend to higher viability when compared with hepatocytes treated with medium only. A concentration of 5 µmol/L was considered safe (Table 1).

In the microphotographs we observed detachment from collagen, granulation of cytoplasm, spherical shape, and loss of nuclear visibility in some of the cells, as well as larger quantities of detritus in both groups at concentrations of 10 µmol/L and higher (Figs. 1a–1f). At later time intervals, the toxicity observed in cells exposed to 10 µmol/L EGCG was even more pronounced, and signs of toxicity were noted even at 5 µmol/L EGCG (data not shown).

**Fig. 2.** The activity of caspase 3 and caspase 7 in hepatocytes from male Wistar rats, 24 h after isolation. Note the highest activity is in hepatocytes from rats subjected to partial hepatectomy (PHx) and treated with 15 µmol/L epigallocatechin gallate (EGCG). \*, \*\*, \*\*\*, compared with the control rats (laparotomy; LAP); †, ††, †††, compared with the rats subjected to control PHx (PHx rats treated with medium only);  $p < 0.05$ , 0.01, and 0.001, respectively.



### Oxidative stress

The ROS production, as determined by DCFDA, was higher in hepatocytes from rats after LAP, especially in the control and cells treated with 1 µmol/L EGCG. At higher concentrations, the ROS production was similar in hepatocytes from both groups of rats.

Interestingly, there was an opposite trend in lipid peroxidation assessed by MDA levels, i.e., higher levels in hepatocytes from rats after PHx than from rats after LAP, and lipid peroxidation was higher in hepatocytes exposed to high doses of EGCG (Table 1).

### Caspase 3/7 activities

The activity of caspases 3 and 7 increased at concentrations of ≥10 µmol/L EGCG in rats after PHx, but only at 10 µmol/L EGCG in LAP rats. At 15 µmol/L, the caspase activity was higher (even though not significantly) in hepatocytes from animals after PHx than in hepatocytes from animals after LAP (Fig. 2).

### DNA synthesis

There was a trend toward higher DNA synthesis in hepatocytes from hepatectomized rats when compared with rats that underwent laparotomy, as shown by BrdU incorporation. EGCG led to a decrease in DNA synthesis. Interestingly, at doses ≥10 µmol/L EGCG, the BrdU incorporation in hepatocytes from LAP rats was even lower than in the background control (Table 1).

### Protein expression

We were not able to detect Bcl-2 at the protein level. The expressions of DR5 and p-p53 proteins did not differ among groups (Fig. 3).

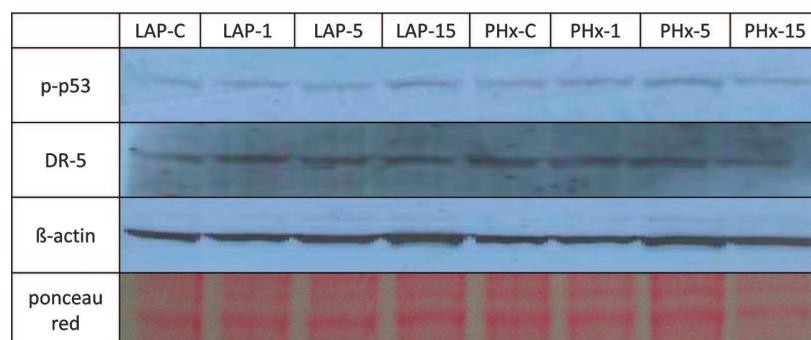
## Discussion

In this study, we have shown a toxic effect of EGCG on hepatocytes isolated from rats after both PHx and LAP. Contrary to other authors (Galati et al. 2006) who reported toxicity from concentrations of 200 µmol/L, we observed small but significant levels of toxicity already at a concentration of 10 µmol/L after 24 h of cultivation. This difference might have been caused by a different rat strain, minor differences during isolation and (or) cultivation, but also by the prior exposure of our rats to general anesthesia and surgery. This explanation is supported by studies with mice which have shown that the toxicity of EGCG is significantly strain-dependent (Goodin et al. 2006).

Pharmacokinetic studies of EGCG in rats have shown that the maximum plasma concentration is 4.7 µg/mL after intravenous administration of 10 mg/kg body mass and decreases by an order



**Fig. 3.** Western Blot of phospho-p53 and DR5 protein in hepatocytes from male Wistar rats;  $\beta$ -actin and Ponceau Red were used as loading controls. LAP-C and PHx-C indicate medium-treated hepatocytes, numbers denote the concentrations of epigallocatechin gallate. No differences were observed among the groups.



of one magnitude during less than 100 min owing to distribution. After intragastric administration of 75 mg/kg body mass, the maximum plasma concentration was only 19.8 ng/mL (Chen et al. 1997). Our lowest dose of 1  $\mu$ mol/L corresponds to 0.46  $\mu$ g/mL, the initial toxic dose of 10  $\mu$ mol/L to 4.58  $\mu$ g/mL, and the highest dose of 15  $\mu$ mol/L to 6.87  $\mu$ g/mL. Thus, the concentrations used in this study may occur during a short period following intravenous administration of EGCG. This can also help to explain signs of toxicity seen in our previous study (Mezera et al. 2014), in which we administered EGCG by intraperitoneal injection in a dose of 50 mg/kg body mass.

It should be emphasized that the kinetics differs in humans: a single oral dose of 1600 mg EGCG (approximately 22.2 mg/kg body mass) led to a maximum plasma concentration of 3.39  $\mu$ g/mL (Ullmann et al. 2003). Hypothetically, assuming a similar susceptibility in human hepatocytes, overuse of EGCG supplements could be dangerous during the perioperative period. On the other hand, after drinking the equivalent of 2 cups of tea, the mean peak plasma EGCG level was 0.17  $\mu$ mol/L (corresponding to 78.2 ng/mL), suggesting that modest drinking of green tea is safe (Lee et al. 2002).

The ROS production was neither clearly inhibited nor suppressed by EGCG. Interestingly, at low concentrations of EGCG, the hepatocytes from rats after PHx displayed lower production, which is contrary to the findings of other authors (Frances et al. 2007). Discrepant results may perhaps be explained by the differing study designs. Frances et al. (2007) isolated the hepatocytes 1 h after surgery, whereas we used a 24 h interval. On the other hand, we observed a trend toward higher lipid peroxidation in hepatocytes from rats after PHx than from rats after LAP. In another experiment, we looked at the effect of EGCG on functions of isolated mitochondria. There we observed dose-dependent uncoupling of mitochondrial oxidative phosphorylation and damage to the inner mitochondrial membrane (unpublished data).

As expected, hepatocytes isolated from rats after PHx had a tendency to higher incorporation of BrdU. EGCG led to a dose-dependent decrease, suggesting inhibition of DNA synthesis. This is in accordance with its reported antiproliferative effect (Singh et al. 2011). Interestingly, the BrdU incorporation appeared even lower than the background control in hepatocytes from LAP rats exposed to high concentrations of EGCG. In light of other methods used in this study, this can be explained by the decline in the number of cells.

An important finding from this study was that EGCG led to an activation of executioner caspases 3 and 7. This is in accordance with its tumor-suppressing effect (Singh et al. 2011; Abou El Naga et al. 2013), although it disagrees with the findings of some other authors (Thangapandiyan and Miltonprabu 2013). Inconsistent findings could be caused by the very complex effects of EGCG, which probably acts differently on cancer cells, on cells exposed

to toxins, and on hepatocytes isolated from regenerating liver. In other words, the effect of EGCG seems to be stress-dependent (Crispo et al. 2010). Furthermore, the activities of caspases 3 and 7 were higher in hepatocytes from hepatectomized rats when compared with laparotomized controls. This corresponds to our previous findings in vivo (Mezera et al. 2014), and can be explained by a peak in pro-apoptotic proteins (which are otherwise downregulated during liver regeneration) at 24 h after PHx (Tzung et al. 1997).

EGCG was reported to downregulate the expression of Bcl-2 in cancer cells (Singh et al. 2011; Abou El Naga et al. 2013). According to a clinical study in patients with non-alcoholic fatty liver disease, serum Bcl-2 concentrations were lower in patients with non-alcoholic steatohepatitis when compared with patients with simple steatosis, suggesting its diagnostic potential (Tarantino et al. 2011). In this study, we did not detect Bcl-2 at the protein level; however, other authors have also reported Bcl-2 below the detection limit of Western Blot (Tzung et al. 1997).

The activation of p-p53, which is one of the antiproliferative mechanisms of EGCG (Singh et al. 2011), did not differ among the groups. Recently, upregulation of DR5 and other death receptors upon EGCG exposure have been described, which would lead to an increase in the susceptibility of HepG2 cells to apoptosis (Abou El Naga et al. 2013). However, in our study, we did not find any difference in DR5 expression among the groups. Thus, neither the dose of EGCG nor the type of operation affected the expression of DR5 in this study.

Another way to explain the EGCG toxicity is the depletion of reduced glutathione (GSH), as reported in literature (Galati et al. 2006). Similarly, EGCG led to GSH depletion under some, but not all, stressed conditions in PC12 cells (Crispo et al. 2010). GSH was identified as mediating part of the ability of Bcl-2 to suppress apoptosis (Voehringer 1999). Depletion of GSH might leave the cells more susceptible to apoptosis.

The results of our study cannot be translated widely, since the strain of a particular species plays a role in the susceptibility to EGCG toxicity (Goodin et al. 2006). This is one of the limitations of this study — we used only one strain of one species, and only males.

In conclusion, EGCG in a dose of 10  $\mu$ mol/L and higher displayed a toxic effect on hepatocytes isolated both from rats after LAP and after PHx cultivated for 24 h. The hepatocytes from rats after PHx had a higher tendency to apoptosis, especially at high concentrations of EGCG.

## Acknowledgements

This work was supported by grants from Charles University in Prague (GA UK 668512, PRVOUK P37/02, and SVV-2013-266901). We would like to thank to Matthew Shane Renfro for the language

review and to Dr. Mohamed Niang for translation of the abstract into French.

## References

- Abou El Naga, R.N., Azab, S.S., El-Demerdash, E., Shaarawy, S., El-Merzabani, M., and Ammar el, S.M. 2013. Sensitization of TRAIL-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells by phytochemicals. *Life Sci.* **92**(10): 555–561. doi:[10.1016/j.lfs.2013.01.017](https://doi.org/10.1016/j.lfs.2013.01.017). PMID:23352978.
- Berry, M.N., Edwards, A.M., and Barritt, G.J. 1991. High-yield preparation of isolated hepatocytes from rat liver. In *Isolated hepatocytes: preparation, properties and application*. Edited by R.H. Burdon and P.H. van Knippenberg. Elsevier, New York, N.Y. pp. 15–58.
- Chen, L., Lee, M.J., Li, H., and Yang, C.S. 1997. Absorption, distribution, elimination of tea polyphenols in rats. *Drug Metab. Dispos.* **25**(9): 1045–1050. PMID:9311619.
- Crispo, J.A., Ansell, D.R., Piche, M., Eibl, J.K., Khaper, N., Ross, G.M., et al. 2010. Protective effects of polyphenolic compounds on oxidative stress-induced cytotoxicity in PC12 cells. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **88**(4): 429–438. doi:[10.1139/Y09-137](https://doi.org/10.1139/Y09-137). PMID:20555411.
- Fiorini, R.N., Donovan, J.L., Rodwell, D., Evans, Z., Cheng, G., May, H.D., et al. 2005. Short-term administration of (–)-epigallocatechin gallate reduces hepatic steatosis and protects against warm hepatic ischemia/reperfusion injury in steatotic mice. *Liver Transpl.* **11**(3): 298–308. doi:[10.1002/lt.20348](https://doi.org/10.1002/lt.20348). PMID:15719408.
- Frances, D., Ronco, M.T., Ochoa, E., Alvarez, M.L., Quiroga, A., Parody, J.P., et al. 2007. Oxidative stress in primary culture hepatocytes isolated from partially hepatectomized rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **85**(10): 1047–1051. doi:[10.1139/Y07-087](https://doi.org/10.1139/Y07-087). PMID:18066106.
- Galati, G., Lin, A., Sultan, A.M., and O'Brien, P.J. 2006. Cellular and in vivo hepatotoxicity caused by green tea phenolic acids and catechins. *Free Radic. Biol. Med.* **40**(4): 570–580. doi:[10.1016/j.freeradbiomed.2005.09.014](https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.09.014). PMID:16458187.
- Goodin, M.G., Bray, B.J., and Rosengren, R.J. 2006. Sex- and strain-dependent effects of epigallocatechin gallate (EGCG) and epicatechin gallate (ECG) in the mouse. *Food Chem. Toxicol.* **44**(9): 1496–1504. doi:[10.1016/j.fct.2006.04.012](https://doi.org/10.1016/j.fct.2006.04.012). PMID:16762473.
- Higgins, G.M., and Anderson, R.M. 1931. Experimental pathology of the liver. I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch. Pathol.* **12**: 186–202.
- ILAR (Institute of Laboratory Animal Resources). 2001. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. NIH Publication No. 85-23 (revised 1996). National Academy Press, Washington, D.C. Available from [http://www.nap.edu/openbook.php?record\\_id=5140](http://www.nap.edu/openbook.php?record_id=5140).
- Kucera, O., Al-Dury, S., Lotkova, H., Rousar, T., Rychtrmoc, D., and Cervinkova, Z. 2012. Steatotic rat hepatocytes in primary culture are more susceptible to the acute toxic effect of acetaminophen. *Physiol. Res.* **61**(Suppl. 2): S93–S101. PMID:23130907.
- Kuzu, N., Bahcecioglu, I.H., Dagli, A.F., Ozercan, I.H., Ustundag, B., and Sahin, K. 2008. Epigallocatechin gallate attenuates experimental non-alcoholic steatohepatitis induced by high fat diet. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **23**(8): e465–e470. doi:[10.1111/j.1440-1746.2007.05052.x](https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2007.05052.x). PMID:17683497.
- Lee, M.J., Maliakal, P., Chen, L., Meng, X., Bondoc, F.Y., Prabhu, S., et al. 2002. Pharmacokinetics of tea catechins after ingestion of green tea and (–)-epigallocatechin-3-gallate by humans: formation of different metabolites and individual variability. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **11**(10): 1025–1032. PMID:12376503.
- Mezera, V., Kucera, O., Moravcova, A., Peterova, E., and Cervinkova, Z. 2014. Epigallocatechin gallate does not accelerate the early phase of liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *Dig. Dis. Sci.* **59**(5): 976–985. doi:[10.1007/s10620-013-2966-5](https://doi.org/10.1007/s10620-013-2966-5). PMID:24318805.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., and Yagi, K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* **95**(2): 351–358. doi:[10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3). PMID:36810.
- Singh, B.N., Shankar, S., and Srivastava, R.K. 2011. Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): mechanisms, perspectives and clinical applications. *Biochem. Pharmacol.* **82**(12): 1807–1821. doi:[10.1016/j.bcp.2011.07.093](https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.07.093). PMID:21827739.
- Tarantino, G., Scopacasa, F., Colao, A., Capone, D., Tarantino, M., Grimaldi, E., et al. 2011. Serum Bcl-2 concentrations in overweight-obese subjects with nonalcoholic fatty liver disease. *World J. Gastroenterol.* **17**(48): 5280–5288. doi:[10.3748/wjg.v17.i48.5280](https://doi.org/10.3748/wjg.v17.i48.5280). PMID:22219597.
- Thangapandian, S., and Miltonprabu, S. 2013. Epigallocatechin gallate effectively ameliorates fluoride-induced oxidative stress and DNA damage in the liver of rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **91**(7): 528–537. doi:[10.1139/cjpp-2012-0347](https://doi.org/10.1139/cjpp-2012-0347). PMID:23826622.
- Tzung, S.P., Fausto, N., and Hockenbery, D.M. 1997. Expression of Bcl-2 family during liver regeneration and identification of Bcl-x as a delayed early response gene. *Am. J. Pathol.* **150**(6): 1985–1995. PMID:9176392.
- Ullmann, U., Haller, J., Decourt, J.P., Girault, N., Girault, J., Richard-Caudron, A.S., et al. 2003. A single ascending dose study of epigallocatechin gallate in healthy volunteers. *J. Int. Med. Res.* **31**(2): 88–101. doi:[10.1177/147323000303100205](https://doi.org/10.1177/147323000303100205). PMID:12760312.
- Voehringer, D.W. 1999. BCL-2 and glutathione: alterations in cellular redox state that regulate apoptosis sensitivity. *Free Radic. Biol. Med.* **27**(9–10): 945–950. doi:[10.1016/S0891-5849\(99\)00174-4](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(99)00174-4). PMID:10569627.

Title:

**Comparison of acetaminophen toxicity in primary hepatocytes isolated from transgenic mice with different apolipoprotein E alleles**

Authors:

Vojtech Mezera<sup>1</sup>, [mezev5ar@lfhk.cuni.cz](mailto:mezev5ar@lfhk.cuni.cz)

Otto Kucera<sup>1</sup>, [kucerao@lfhk.cuni.cz](mailto:kucerao@lfhk.cuni.cz)

Alena Moravcova<sup>1</sup>, [moravca2@lfhk.cuni.cz](mailto:moravca2@lfhk.cuni.cz)

Eva Peterova<sup>2</sup>, [peterovae@lfhk.cuni.cz](mailto:peterovae@lfhk.cuni.cz)

Tomas Rousar<sup>1</sup>, [tomas.rousar@upce.cz](mailto:tomas.rousar@upce.cz)

David Rychtrmoc<sup>1</sup>, [rychtrmocd@lfhk.cuni.cz](mailto:rychtrmocd@lfhk.cuni.cz)

Ondrej Sobotka<sup>1</sup>, [sobotkao@lfhk.cuni.cz](mailto:sobotkao@lfhk.cuni.cz)

Zuzana Cervinkova<sup>1</sup>, [wolff@lfhk.cuni.cz](mailto:wolff@lfhk.cuni.cz)

<sup>1</sup> - Department of Physiology; <sup>2</sup> - Department of Medical Biochemistry

Faculty of Medicine in Hradec Kralove, Charles University in Prague, Czech Republic

Corresponding author:

Vojtech Mezera

Department of Physiology

Charles University in Prague

Faculty of Medicine in Hradec Kralove

Simkova 870

500 38 Hradec Kralove 1

Czech Republic

E-mail: [mezev5ar@lfhk.cuni.cz](mailto:mezev5ar@lfhk.cuni.cz)

Phone: +420495816471

Fax: +420495518772

## **Abstract**

Nrf2 is a transcription factor, important for combating oxidative stress in the liver and other organs and detoxification of hepatotoxic drugs, including acetaminophen (APAP). The Nrf2 expression is associated with the apolipoprotein E (ApoE) genotype.

We compared the toxicity of APAP on primary culture of hepatocytes isolated from transgenic mice carrying two different human ApoE alleles (ApoE3 resp. ApoE4) and wild-type (WT) controls and exposed to APAP for 24 hours.

APAP led to a dose-dependent hepatotoxicity in all mice tested, least in WT mice and most in ApoE3 mice. Concurrently, there was a decline in mitochondrial membrane potential, especially in ApoE3 hepatocytes. The formation of reactive oxygen species after 24 hours with 2.5 mM APAP was most increased in hepatocytes of the ApoE3 genotype. Caspases 3 and 7 were not activated upon APAP treatment. We observed higher lipid accumulation in hepatocytes isolated from both transgenic strains than in WT controls. The expression of Nrf2-dependent genes was higher in ApoE3 than in ApoE4 hepatocytes.

In conclusion, transgenic mice with ApoE4 and ApoE3 alleles displayed higher susceptibility to acute APAP toxicity *in vitro* than WT mice. Of the two transgenic genotypes tested, ApoE3 allele carriers were more prone to injury.

### **Keywords:**

Acetaminophen, apolipoproteins E, hepatocytes, Nrf2, oxidative stress, primary cell culture

## Introduction

Acetaminophen (APAP), also known as paracetamol, is a widely used analgesic and antipyretic. APAP is safe when administered in modest doses; however, high doses can lead to liver injury or even liver failure [1-3]. Patients abusing alcohol are at high risk of developing liver injury [1, 4]. Similarly, non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) seems to predispose liver to the toxicity of APAP and other toxicants [5-8]. In healthy subjects, a single dose of 3 g did not increase the signs of oxidative stress [9].

Early administration of N-acetylcysteine remains the main therapeutic option for APAP overdose [1]. Several other strategies were suggested to ameliorate the APAP-induced liver injury: inhibition of 5-lipoxygenase [10], inhibition of protein tyrosine phosphatase 1B [11], induction of PPAR $\alpha$  [12], activation of autophagy [13] and activation of Nrf2 [14]. So far, the evidence is limited to experimental work.

Nrf2 is a transcription factor important for combating electrophilic and oxidative stress in the liver and other organs [15, 16]. This encompasses the detoxification of hepatotoxic drugs such as acetaminophen (APAP). Mice with Nrf2 gene knockout were more susceptible [17, 18] and mice with Nrf2 activation were more resistant to the toxicity of APAP [14, 19-21]. Nrf2 can be activated by many phytochemicals as well as synthetic substances [15, 20, 22, 23].

Recently, an association between the apolipoprotein E (ApoE) genotype and Nrf2 expression was described [24]. The authors found lower nuclear Nrf2 levels as well as lower expression of Nrf2-dependent genes in transgenic mice carrying the human ApoE4 allele when compared to mice carrying the human ApoE3 allele. This could be due to differences in PPAR $\gamma$  receptors or a more proinflammatory state in the ApoE4 vs. ApoE3 genotype [24]. Formerly, the ApoE4 allele was recognized as posing a greater cardiovascular risk compared to the ApoE3 allele [25].

In addition, in patients with primary biliary cirrhosis, the ApoE4 genotype constituted a high risk of severe disease and poor response to treatment [26]. On the other hand, the ApoE4 genotype was identified as protective against NAFLD when compared to the ApoE3 genotype [27, 28]. To the best of our knowledge, the relation between the ApoE genotype and APAP toxicity has not yet been investigated.

In the present study, we compared the toxicity of APAP on primary culture hepatocytes isolated from transgenic mice carrying different human ApoE alleles (ApoE3 or ApoE4) and from wild-type controls.

## Materials and Methods

### ***Chemicals***

Collagenase (lot 120296, 0.12 PZU/mg) was purchased from Seva (Heidelberg, Germany). The anesthetic ketamine (Narketan) was obtained from V  toquinol (Lure Cedex, France) and the xylazine (Rometar) from Bioveta (Ivanovice na Hane, Czech Republic). Reagents and kits are described in the respective paragraphs. All other chemicals were in analytical grade and purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

### ***Animals***

Female mice with targeted replacement of the endogenous mouse ApoE gene with human ApoE3 or ApoE4 gene on a C57Bl/6 background (age 7-9 weeks, body weight  $20.2 \pm 1.3$  g) were purchased from Taconic (Hudson, NY, USA). Female C57Bl/6 age-matched mice, obtained from Velaz (Unetice, Czech Republic), were used as wild-type (WT) controls. The mice were housed at  $23 \pm 1$  °C,  $55 \pm 10$  % humidity, with air exchange 12–14 times/h and a 12h light–dark cycle. All animals had free access to tap water and were fed a standard ST-1 pelleted diet *ad libitum* (Velas, Lysa nad Labem, Czech Republic). All animal care was in accordance with Czech legislation. Our study was approved by the Institutional Animal Use and Care Committee of the Faculty of Medicine in Hradec Kralove and by the Czech Ministry of the Environment.

### ***Hepatocyte preparation***

Before the isolation, the mice were pre-anesthetized with ether and then injected intraperitoneally with a mixture of ketamine (100 µg/g body weight) and xylazine (10 µg/g body weight) dissolved in water for injections. Hepatocytes were isolated by two-step collagenase perfusion as described by Bajt et al. [29] with some modifications. Before opening the abdominal cavity, heparin was injected intraperitoneally (0.5 IU/g body weight) to prevent blood clotting throughout the subsequent steps. After opening the abdominal cavity, the falciform ligament was deranged and the gallbladder excised. The portal vein was then cannulated with a 20G needle and the liver perfused *in situ*, first with a calcium-free solution for 3 minutes, then with a solution containing collagenase (1 mg/ml). When the liver took up a sponge-like appearance (8-10 minutes), it was excised and mechanically separated into a



suspension of hepatocytes. The suspension was purified by filtration through sterile gauze and underwent repeated centrifugation in a cold centrifuge at 28 g.

Cell viability was determined by a Trypan blue exclusion test (in all isolations > 80%). Cell density was counted using a Cellometer (Nexcelom Bioscience, Lawrence, MA, USA). Afterwards, the suspension was diluted in Williams E medium enriched with 6% fetal bovine serum (Merck Millipore, Berlin, Germany), glutamine (2 mmol/l), penicillin (100 IU/ml), streptomycin (10 mg/ml), insulin (0.08 IU/ml), dexamethasone (0.12 µg/ml) and glucagon (0.008 µg/ml) at a density of  $4 \times 10^5$  cells/ml. After seeding on collagen-coated cultivating 6-well (2 ml per well; for qRT-PCR), 12-well (1 ml per well; for phase contrast imaging and protein isolation), 24-well (0.3 ml; for LDH leakage, glutathione levels and Oil Red O staining) and 96-well (0.1 ml; for WST-1 test, reactive oxygen species measurements and caspase activities) NUNC plates (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) for 2 hours, the medium was removed and the serum-free Williams E medium with concentrations of APAP ranging from 0.5 mmol/l to 4 mmol/l was added. The cells were incubated at 37°C in an atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> for up to 24 hours.

### ***Microscopic evaluation***

All images were taken using an Olympus IX51 microscope with an E-600 Digital Camera (Olympus Imaging Corp., Tokyo, Japan) and Quick Photo Camera 3.0 software (Promicra, Prague, Czech Republic). Scale bars, arrows and arrowheads were added using the Quick Photo Camera software; no other image editing was performed. The objective magnifications used was 40x. All the types of staining described below were performed at room temperature.

Phase contrast images were taken at 4 h and 24 h after isolation.

To semi-quantify the presence of lipids, we used a Steatosis Colorimetric Assay Kit (Cayman Chemical Comp., Ann Arbor, MI, USA) based on Oil Red O dye; haematoxylin was used for nuclear counter-staining. We checked for Oil Red positive cells, i.e. cells with orange-red cytoplasm in the bright field mode. The positive cells were then counted in at least 10 visual fields; at least 500 cells were included. The percentage of positivity was then calculated.

The mitochondrial membrane potential was evaluated using JC-1 Dye (from Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) as described previously [30]. Briefly, the cells were incubated for 45 minutes at 37°C with 10 µM JC-1 dye dissolved in the medium. After washing, the cells were visualized in fluorescence mode. The percentage of cells with high

mitochondrial membrane potential was counted; at least 230 cells per group were included.

### ***Viability tests: WST-1, lactate dehydrogenase activity and leakage***

The activity of intracellular dehydrogenases was determined using Cell Proliferation Reagent WST-1 (Roche, Penzberg, Germany) as described previously [31]. The medium was removed and the WST-1 reagent diluted in Williams E medium 1:10 was added to the cells. Absorbance at 450 nm was measured at time 0 and at 60 minutes using a TECAN Infinite M200 spectrophotometer (Tecan Group AG, Männedorf, Switzerland). The difference between these values was calculated and used for statistical evaluation.

Lactate dehydrogenase (LDH) activity was measured in the media and in the cell lysate using a commercial kit from DiaSys (Holzheim, Germany). In order to lyse the cells, we collected the media, added Cell Lysis Buffer (from Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) and scraped the cells. The LDH leakage was calculated as a ratio of extracellular and total LDH [32].

### ***Markers of oxidative stress: DCFDA and malondialdehyde***

The production of reactive oxygen species (ROS) was determined using fluorescence probe dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFDA) obtained from Life Technologies, as described previously [30] with the exception that the cells were incubated for 55 minutes with the DCFDA probe.

The presence of malondialdehyde (MDA), a marker of lipid peroxidation, was determined by assessing the thiobarbituric acid reactive substances in the medium [33, 34].

### ***Reduced glutathione and APAP-glutathione conjugates***

The content of reduced glutathione (GSH) was determined after 4 h and 24 h of incubation with APAP. The medium was removed and the cells were lysed in distilled water. Afterwards, 5% cold metaphosphoric acid was added and the samples were centrifuged (20,000 g, 4 °C). The levels of GSH in the supernatant were measured using a modified fluorimetric method [35].

Sample preparation was identical for measurement of conjugate of APAP with glutathione (APAP-SG). The levels of APAP-SG were measured by mass spectrometry as previously described [36].



### ***Caspase 3/7 activities***

The activity of executioner caspases 3 and 7 was assessed 4 h and 24 h after isolation using Caspase Glo 3/7 from Promega (Madison, WI, USA). After removing the media, the cells were exposed to Caspase Glo 3/7 reagent, which induced cell lysis and provided a substrate for caspases 3 and 7. The total luminescence was measured at time 0 min, 60 min and 120 min.

### ***Protein isolation and Western blot analysis***

The levels of antiapoptotic proteins Bcl-2 and Mcl-1 [11], phosphorylated 4E-BP1, an mTOR downstream target [13] and the 2E1 isoform of cytochrome P450, which is able to form a reactive metabolite N-acetyl-p-benzoquinone imine [12] were assessed by means of Western blot. After removing the media, the cells were lysed in Cell Lysis Buffer (Cell Signaling) supplemented with a cOmplete Mini protease inhibitor and a PhosSTOP phosphatase inhibitor (from Roche Applied Science, Penzberg, Germany). The protein content was assessed using the Bradford method. The samples were then adjusted to contain the same amount of protein (30 µg per lane) and subjected to SDS-PAGE using the gradient gels NuPAGE® Novex® Bis-Tris Mini 4 – 12% (Life Technologies). Afterwards, the proteins were transferred to a cellulose nitrate membrane (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) and exposed to the following antibodies: mouse Bcl-2 antibody, rabbit anti-Mcl-1, rabbit anti-CYP2E1, rabbit anti-phospho-4EBP1, all of which were obtained from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA). Mouse anti-β-actin was obtained from Sigma-Aldrich. Secondary goat anti-rabbit and goat anti-mouse IgG were obtained from Santa Cruz Biotechnology. Proteins were visualized using a chemiluminescence detection kit (Roche, Penzberg, Germany) and autoradiographic film (Foma, Hradec Kralove, Czech Republic). To confirm equal protein loading, each membrane was reprobbed and reincubated to detect β-actin. Band density was evaluated using the Quantity One 4.6 software (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). The ratio of band densities of protein of interest and β-actin is referred to as relative density.

### ***RNA isolation and quantitative real-time PCR***

The total RNA from hepatocyte suspensions (leftover that was not used for seeding) and

from the 6-well plates treated for 24 hours was isolated by phenol-chloroform extraction using RNA Blue (Top-Bio, Prague, Czech Republic). Afterwards, the total RNA of each sample was reverse transcribed using oligo-dT primers (Generi Biotech, Hradec Kralove, Czech Republic) and M-MLV Reverse Transcriptase (Top-Bio) according to manufacturers' instructions. Genes of interest were Nrf2-dependent genes [24] glutathione S-transferase 2 (Gsta2), heme oxygenase-1 (Hmox1), NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1 (Nqo1). A primer design summary is provided in Table 1. To avoid genomic DNA contamination, the primers were designed to span exon boundaries. The hydrolyzation probes were labeled with FAM fluorescent reporter dye. The selection of the two housekeeping genes was based on experimental validation of their expression stability: Beta 2-microglobulin (B2m) and Polypeptide A RNA-Polymerase II (Polr2a). Real-time quantitative RT-PCR was performed on a CFX96 Touch cycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) with amplification conditions: 95 °C for 3 min, and 50 cycles of 95 °C for 10 s and 60 °C for 20 s. Each cDNA sample was analyzed in PCR triplicates.

REST 2009 software V2.0.13 (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) was applied to determine statistically significant expression differences and relative fold changes [37].

### ***Statistical analysis***

Hepatocytes were isolated repeatedly three times for ApoE4 and wild-type controls and twice for ApoE3. The results are expressed as means  $\pm$  SD; n values are depicted in tables and figure legends. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism 6.01 software (La Jolla, CA, USA). The numerical data were first tested for normality by means of a Kolmogorov-Smirnoff test. Data with Gaussian distribution were analyzed with ANOVA and Tukey's post-test. Data with non-Gaussian distribution were analyzed by Kruskal-Wallis test and Dunn's post-test.  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

## **Results**

### ***Cell viability***

As shown by the activity of extracellular lactate dehydrogenase, APAP led to a dose- and time-dependent toxicity. After 16 h exposure to 1 mM, the apparent (two or more times higher) increase was significant ( $p < 0.01$ ) in both transgenic strains and non-significant in WT mice (Fig 1a). After 20 h, the increase was most pronounced in ApoE3 hepatocytes. The

damage after 24 h incubation identified by LDH leakage tended to be worst in hepatocytes from ApoE3 mice in concentrations of 0.75 mmol/l and 1 mmol/l APAP. When exposed to 4 mmol/l APAP, the LDH leakage reached 90% and was similar in all groups, suggesting necrosis in most of the cells (Fig 1b).

In the WST-1 test, the activity of cellular dehydrogenases was significantly lower in hepatocytes treated with 4 mmol/l APAP for 24 h when compared to untreated controls ( $p < 0.001$  in all genotypes). This decrease was more pronounced in both transgenic strains, most in ApoE3 mice (Table 2).

Incubation of hepatocytes of all genotypes with 1 mmol/l APAP led to signs of cellular damage visible in phase contrast microscopy: detachment of cells from collagen, spherical shape and plasma membrane blebbing, highly granular cytoplasm, loss of nuclear visibility. The loss of nuclear visibility was most pronounced in hepatocytes from ApoE3 mice. We also observed distinct intracellular vacuoli resembling lipid droplets in untreated controls of both transgenic strains.

### ***Lipid accumulation***

The percentage of Oil Red O positive cells was higher in both untreated controls of ApoE4 and ApoE3 mice when compared to wild-type controls after 24 h cultivation ( $p < 0.05$  for ApoE4 and  $p < 0.001$  for ApoE3). The percentage of positive cells did not differ significantly among transgenic mice (Fig 2a-d).

### ***Mitochondrial membrane potential***

After the 4 h incubation, there was a significant decrease in the percentage of cells with high mitochondrial membrane potential (MMP) in cells from ApoE3 mice exposed to 4 mmol/l APAP when compared to untreated controls and corresponding wild-type hepatocytes ( $p < 0.001$  for both comparisons). The potential was higher in untreated cells from ApoE3 mice when compared to wild-type mice ( $p < 0.05$ ) (Fig 3g).

After 24 h, there was a significant ( $p < 0.01$ ) decrease in MMP in cells exposed to the concentrations of APAP from 1 mmol/l in all genotypes tested (Fig 3d-f). The MMP was completely lost in hepatocytes from ApoE3 mice exposed to 1 mmol/l APAP for 24 hours while in hepatocytes from WT and ApoE4 mice after exposure to 2 mmol/l APAP. Concentrations of 0.5 mmol/l APAP did not affect the mitochondrial membrane potential (Fig 3h).

### ***Oxidative stress***

The ROS production displayed a non-significant increase at 2.5 mmol/l APAP in hepatocytes from WT mice and a significant increase in both transgenic strains ( $p < 0.01$  for ApoE4 and  $p < 0.001$  for ApoE3) after 24 hour cultivation (Table 2).

The levels of MDA in the culture medium did not differ among groups and were not significantly affected by APAP treatment. Only a non-significant trend to higher MDA production at 1 mmol/l and 4 mmol/l APAP was observed in all genotypes (Table 2).

### ***GSH and APAP-glutathione conjugates***

A dose-dependent decline in GSH levels was observed in all APAP-exposed cells. At the highest dose of APAP (4 mmol/l), the GSH levels were below the detection limit in both transgenic strains. After 24 h treatment with 1 mmol/l APAP, the levels were lowest in hepatocytes from ApoE3 mice (non-significant difference between genotypes) (Table 2).

The levels of APAP-SG after 4 hour cultivation were under the detection limit in cells exposed to concentrations of 1 mmol/l APAP and lower. At concentrations of 4 mmol/l APAP, the levels were higher in both transgenic strains when compared to wild-type controls ( $p < 0.01$  for ApoE4, non-significant for ApoE3). There was no significant difference between the transgenic strains (Table 2).

### ***Caspase activities***

The activity of executioner caspases 3 and 7 did not differ among groups at the 4-hour interval (not shown). When exposed to 4 mmol/l APAP for 24 hours, there was a distinct decrease in all genotypes, most visible in ApoE3 (Table 2). Similar results were obtained when recalculating the values to the relative luminiscence per  $\mu\text{g}$  of protein (not shown).

### ***Western blot analysis***

The levels of antiapoptotic protein Bcl-2 were down-regulated in hepatocytes treated with 4 mmol/l APAP for 4 hours. This decline was more pronounced in WT and ApoE4 than in ApoE3 cells (Fig 4b). We did not observe major differences in the expression of another antiapoptotic protein, Mcl-1 (Fig 4a).

The expression of phosphorylated 4E-BP1 displayed an increase after 4 hours of treatment

with 1 and 4 mmol/l APAP in wild-type hepatocytes. In ApoE4 cells, there was a decline in phospho-4E-BP1, especially in cells exposed to 4 mmol/l APAP. Only a mild decrease after exposure to 1 and 4 mmol/l APAP was observed in ApoE3 cells (Fig 4c).

The levels of the 2E1 isoform of cytochrome P450 showed a mild decrease when treated with 4 mmol/l APAP in all genotypes tested (Fig 4a).

### ***Gene expression of Nrf2-dependent genes Nqo1, Hmox1, Gsta2***

In the suspension of hepatocytes, there was a lower expression of Gsta2 and higher expression of Hmox1 in hepatocytes from ApoE4 mice when compared to wild-type hepatocytes ( $p<0.05$ ). A similar but non-significant trend was observed when comparing ApoE3 vs. WT. There were no significant differences between the transgenic strains (not shown).

In hepatocytes cultured for 24 hours, the yield of RNA was sufficient only in cells treated with medium or 0.5 mmol/l APAP; we were not able to analyze the RNA from cells exposed to 1 mmol/l APAP and higher. The expression of Gsta2 and Nqo1 was lower in control ApoE4 hepatocytes when compared to control WT hepatocytes ( $p<0.001$ ). The expression of Gsta2 was also lower in control ApoE3 hepatocytes when compared to control WT hepatocytes ( $p<0.05$ ). All three genes displayed a higher expression in control ApoE3 hepatocytes when compared to control ApoE4 hepatocytes ( $p<0.05$  for Gsta2 and  $p<0.01$  for Nqo1 and Hmox1) (Fig 4d).

In cells exposed to 0.5 mmol/l APAP, there was a lower expression of Gsta2 ( $p<0.001$ ) and Nqo1 ( $p<0.05$ ) when comparing ApoE4 and WT hepatocytes. The expression of Gsta2 was downregulated ( $p<0.05$ ) and Hmox1 upregulated ( $p<0.01$ ) when comparing ApoE3 and WT hepatocytes. Again, all three genes of interest were higher in ApoE3 when compared to ApoE4 hepatocytes ( $p<0.01$  for Gsta2 and Nqo1 and  $p<0.001$  for Hmox1) (Fig 4e).

When comparing medium-treated cells with cells treated with 0.5 mmol/l APAP, there was an increase in Gsta2 and/or Hmox1 in all genotypes tested: increase in Gsta2 in WT hepatocytes ( $p<0.05$ ), Hmox1 in ApoE4 hepatocytes ( $p<0.01$ ), Gsta2 and Hmox1 in ApoE3 hepatocytes ( $p<0.001$ ) (not depicted).

## **Discussion**

In the present study, APAP led to a dose-dependent hepatotoxicity in all mice tested. The toxicity was higher in both transgenic strains than in wild-type controls and most pronounced

in ApoE3 mice. When exposed to 4 mmol/l APAP for 24 hours, nearly all cells displayed necrotic cell death.

We were able to reproduce the main findings of Graeser et al. [24], i.e. higher expression of Nrf2-dependent genes in cultivated hepatocytes from ApoE3 mice when compared to ApoE4 mice. The exposure to APAP led to the activation of some of the Nrf2-dependent genes in all genotypes tested, which is in accordance with other authors [11]. Similarly, hydrogen peroxide- and tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative stress led to an upregulation of some endogenous antioxidant genes in young hepatocytes [38].

Our findings of a decline in mitochondrial membrane potential after the treatment with APAP are in agreement with the findings of Hwang et al. [39]. Again, this decline was most pronounced in hepatocytes from ApoE3 mice.

The activity of executioner caspases 3 and 7 was not increased upon APAP treatment, despite downregulation of the antiapoptotic protein Bcl-2. In light of other methods used, this is probably caused by a decrease in the total cell count due to necrosis. However, even when related to protein amount per sample, the activity was still lowest in hepatocytes treated for 24 hours with 4 mmol/l APAP. Our results are in accordance with Ni et al. [13], who reported cell death by necrosis only and in contrary to the findings of Mobasher et al. [11], who noticed activation of apoptosis. Inconsistency may be caused by different times and conditions of cultivation, doses of APAP and methods used for quantifying apoptosis.

The higher toxicity of APAP in both transgenic strains, when compared to wild-type controls, may be partly explained by lipid accumulation. In previous studies, hepatocytes and/or liver affected by NAFLD were more susceptible to APAP toxicity than lean ones [6, 12, 40]. This could be due to the induction of CYP2E1 activity by some lipid derivatives which then leads to high formation of reactive metabolite N-acetyl-p-benzoquinone imine [8]. In addition, lipid accumulation *per se* seems to be a condition of increased oxidative stress [30]. In the present study, we were not able to confirm the results of Graeser et al. [24], who reported higher hepatic triglycerides in ApoE4 than in ApoE3 mice.

There was a rapid increase in ROS production at 2.5 mmol/l APAP after 24 hour cultivation in both transgenic strains but not in WT mice. Interestingly, the relative increase was highest in hepatocytes from ApoE3 mice. A decline in GSH levels was observed in all strains tested; this is in accordance with previous studies and the phenomenon of GSH consumption after APAP treatment [6, 11]. After 24 hour exposure to APAP, this decline was most pronounced in the ApoE3 hepatocytes. These findings did not meet our expectations, since ApoE3 carriers have been reported to display higher antioxidant capacity than ApoE4

carriers [41]. Furthermore, both transgenic strains displayed higher conjugation of APAP with glutathione than WT mice.

Recently, a link between the Nrf2 pathway and autophagy was described [42]. We observed lower levels of phosphorylated 4E-BP1, an mTOR downstream target, in both transgenic strains after treatment with 4 mmol/l APAP, pointing to activation of autophagy. This is in accordance with autophagy activation after APAP treatment [13]. Considering the greater decline in ApoE4 than in ApoE3 hepatocytes, it may be suggested that the extent of autophagy can differ between the two transgenic strains.

Based on our study, there might be several causes leading to worse damage in hepatocytes from ApoE3 mice when compared to ApoE4 mice: a higher ROS production, higher GSH consumption, higher mitochondrial vulnerability, and possibly also different activation of autophagy after APAP treatment.

In conclusion, transgenic mice with ApoE4 and ApoE3 alleles displayed higher susceptibility to acute APAP toxicity *in vitro* than WT mice. Of the two transgenic genotypes tested, ApoE3 allele carriers were more prone to injury. *In vivo* studies would be advisable to confirm the findings of the present study in whole animals and clarify some of the mechanisms.

## **Conflict of interest**

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

## **Acknowledgements**

We would like to thank the Generi Biotech company for its help with qRT-PCR. Also thanks to Matthew Shane Renfro for language review. Our thanks go to Professor John J. Lemasters and Dr. Jiangting Hu for their advice regarding isolation of mouse hepatocytes.

Our work was supported by grants of Charles University in Prague PRVOUK P37/02 and SVV-2015-260179.

## **References**

1. A. M. Larson, J. Polson, R. J. Fontana, T. J. Davern, E. Lalani, L. S. Hynan, J. S. Reisch, F. V. Schiodt, G. Ostapowicz, A. O. Shakil and W. M. Lee, "Acetaminophen-induced acute liver



- failure: results of a United States multicenter, prospective study," *Hepatology*, vol. 42, no. 6, pp. 1364-1372, 2005.
2. R. C. Dart and E. Bailey, "Does therapeutic use of acetaminophen cause acute liver failure?," *Pharmacotherapy*, vol. 27, no. 9, pp. 1219-1230, 2007.
3. H. Jaeschke, T. R. Knight and M. L. Bajt, "The role of oxidant stress and reactive nitrogen species in acetaminophen hepatotoxicity," *Toxicol Lett*, vol. 144, no. 3, pp. 279-288, 2003.
4. H. J. Zimmerman and W. C. Maddrey, "Acetaminophen (paracetamol) hepatotoxicity with regular intake of alcohol: analysis of instances of therapeutic misadventure," *Hepatology*, vol. 22, no. 3, pp. 767-773, 1995.
5. G. Tarantino, P. Conca, V. Basile, A. Gentile, D. Capone, G. Polichetti and E. Leo, "A prospective study of acute drug-induced liver injury in patients suffering from non-alcoholic fatty liver disease," *Hepatol Res*, vol. 37, no. 6, pp. 410-415, 2007.
6. K. Kon, K. Ikejima, K. Okumura, K. Arai, T. Aoyama and S. Watanabe, "Diabetic KK-A(y) mice are highly susceptible to oxidative hepatocellular damage induced by acetaminophen," *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, vol. 299, no. 2, pp. G329-337, 2010.
7. O. Kucera, T. Rousar, P. Stankova, L. Hanackova, H. Lotkova, M. Podhola and Z. Cervinkova, "Susceptibility of rat non-alcoholic fatty liver to the acute toxic effect of acetaminophen," *J Gastroenterol Hepatol*, vol. 27, no. 2, pp. 323-330, 2012.
8. A. Michaut, C. Moreau, M. A. Robin and B. Fromenty, "Acetaminophen-induced liver injury in obesity and nonalcoholic fatty liver disease," *Liver Int*, vol. 34, no. 7, pp. e171-179, 2014.
9. A. Trettin, A. hmer, M.-T. Suchy, I. Probst, U. Staerk, D. O. Stichtenoth, Fr, J. lich, r. C. and D. Tsikas, "Effects of Paracetamol on NOS, COX, and CYP Activity and on Oxidative Stress in Healthy Male Subjects, Rat Hepatocytes, and Recombinant NOS," *Oxid Med Cell Longev*, vol. 2014, pp. 12, 2014.
10. M. S. N. Hohmann, R. D. R. Cardoso, F. A. Pinho-Ribeiro, J. Crespigio, T. M. Cunha, J. Alves-Filho, C., R. V. da Silva, P. Pinge-Filho, S. H. Ferreira, F. Q. Cunha, R. Casagrande and W. A. Verri, "5-Lipoxygenase Deficiency Reduces Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity and Lethality," *BioMed Research International*, vol. 2013, pp. 13, 2013.
11. M. A. Mobasher, A. Gonzalez-Rodriguez, B. Santamaria, S. Ramos, M. A. Martin, L. Goya, P. Rada, L. Letzig, L. P. James, A. Cuadrado, J. Martin-Perez, K. J. Simpson, J. Muntane and A. M. Valverde, "Protein tyrosine phosphatase 1B modulates GSK3beta/Nrf2 and IGFIR signaling pathways in acetaminophen-induced hepatotoxicity," *Cell Death Dis*, vol. 4, pp. e626, 2013.
12. S. Donthamsetty, V. S. Bhave, M. S. Mitra, J. R. Latendresse and H. M. Mehendale, "Nonalcoholic steatohepatic (NASH) mice are protected from higher hepatotoxicity of acetaminophen upon induction of PPARalpha with clofibrate," *Toxicol Appl Pharmacol*, vol. 230, no. 3, pp. 327-337, 2008.
13. H. M. Ni, A. Bockus, N. Boggess, H. Jaeschke and W. X. Ding, "Activation of autophagy protects against acetaminophen-induced hepatotoxicity," *Hepatology*, vol. 55, no. 1, pp. 222-232, 2012.
14. J. Liu, K. C. Wu, Y. F. Lu, E. Ekuase and C. D. Klaassen, "Nrf2 protection against liver injury produced by various hepatotoxicants," *Oxid Med Cell Longev*, vol. 2013, pp. 305861, 2013.
15. Y. J. Surh, J. K. Kundu and H. K. Na, "Nrf2 as a master redox switch in turning on the cellular signaling involved in the induction of cytoprotective genes by some chemopreventive phytochemicals," *Planta Med*, vol. 74, no. 13, pp. 1526-1539, 2008.
16. C. Chen and A. N. Kong, "Dietary chemopreventive compounds and ARE/EpRE signaling," *Free Radic Biol Med*, vol. 36, no. 12, pp. 1505-1516, 2004.
17. A. Enomoto, K. Itoh, E. Nagayoshi, J. Haruta, T. Kimura, T. O'Connor, T. Harada and M.



- Yamamoto, "High sensitivity of Nrf2 knockout mice to acetaminophen hepatotoxicity associated with decreased expression of ARE-regulated drug metabolizing enzymes and antioxidant genes," *Toxicol Sci*, vol. 59, no. 1, pp. 169-177, 2001.
18. S. A. Reisman, I. L. Csanaky, L. M. Aleksunes and C. D. Klaassen, "Altered disposition of acetaminophen in Nrf2-null and Keap1-knockdown mice," *Toxicol Sci*, vol. 109, no. 1, pp. 31-40, 2009.
  19. H. M. Ni, N. Boggess, M. R. McGill, M. Lebofsky, P. Borude, U. Apte, H. Jaeschke and W. X. Ding, "Liver-Specific Loss of Atg5 Causes Persistent Activation of Nrf2 and Protects Against Acetaminophen-Induced Liver Injury," *Toxicological Sciences*, vol. 127, no. 2, pp. 438-450, 2012.
  20. S. A. Reisman, D. B. Buckley, Y. Tanaka and C. D. Klaassen, "CDDO-Im protects from acetaminophen hepatotoxicity through induction of Nrf2-dependent genes," *Toxicol Appl Pharmacol*, vol. 236, no. 1, pp. 109-114, 2009.
  21. W. Xu, C. Hellerbrand, U. A. Kohler, P. Bugnon, Y. W. Kan, S. Werner and T. A. Beyer, "The Nrf2 transcription factor protects from toxin-induced liver injury and fibrosis," *Lab Invest*, vol. 88, no. 10, pp. 1068-1078, 2008.
  22. H. J. Kang, Y. B. Hong, H. J. Kim, A. Wang and I. Bae, "Bioactive food components prevent carcinogenic stress via Nrf2 activation in BRCA1 deficient breast epithelial cells," *Toxicol Lett*, vol. 209, no. 2, pp. 154-160, 2012.
  23. S. I. Gum and M. K. Cho, "The Amelioration of N-Acetyl-p-Benzoquinone Imine Toxicity by Ginsenoside Rg3: The Role of Nrf2-Mediated Detoxification and Mrp1/Mrp3 Transports," *Oxid Med Cell Longev*, vol. 2013, pp. 11, 2013.
  24. A. C. Graeser, C. Boesch-Saadatmandi, J. Lippmann, A. E. Wagner, P. Huebbe, N. Storm, W. Hoppner, I. Wiswedel, A. Gardemann, A. M. Minihane, F. Doring and G. Rimbach, "Nrf2-dependent gene expression is affected by the proatherogenic apoE4 genotype-studies in targeted gene replacement mice," *J Mol Med (Berl)*, vol. 89, no. 10, pp. 1027-1035, 2011.
  25. J. Heeren, U. Beisiegel and T. Grewal, "Apolipoprotein E recycling: implications for dyslipidemia and atherosclerosis," *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, vol. 26, no. 3, pp. 442-448, 2006.
  26. C. Corpechot, P. Benlian, V. Barbu, O. Chazouillères, R. E. Poupon and R. Poupon, "Apolipoprotein E polymorphism, a marker of disease severity in primary biliary cirrhosis?," *J Hepatol*, vol. 35, no. 3, pp. 324-328, 2001.
  27. M. D. Demirag, H. I. Onen, M. Y. Karaoguz, I. Dogan, T. Karakan, A. Ekmekci and G. Guz, "Apolipoprotein E gene polymorphism in nonalcoholic fatty liver disease," *Dig Dis Sci*, vol. 52, no. 12, pp. 3399-3403, 2007.
  28. E. De Feo, C. Cefalo, D. Arzani, R. Amore, R. Landolfi, A. Grieco, W. Ricciardi, L. Miele and S. Boccia, "A case-control study on the effects of the apolipoprotein e genotypes in nonalcoholic fatty liver disease," *Molecular Biology Reports*, vol. 39, no. 7, pp. 7381-7388, 2012.
  29. M. L. Bajt, T. R. Knight, J. J. Lemasters and H. Jaeschke, "Acetaminophen-induced oxidant stress and cell injury in cultured mouse hepatocytes: protection by N-acetyl cysteine," *Toxicol Sci*, vol. 80, no. 2, pp. 343-349, 2004.
  30. O. Kučera, R. Endlicher, T. Roušar, H. Lotková, T. Garnol, Z. Drahota and Z. Červinková, "The Effect of tert-Butyl Hydroperoxide-Induced Oxidative Stress on Lean and Steatotic Rat Hepatocytes In Vitro," *Oxid Med Cell Longev*, vol. 2014, pp. 1-12, 2014.
  31. P. Stankova, O. Kucera, H. Lotkova, T. Rousar, R. Endlicher and Z. Cervinkova, "The toxic effect of thioacetamide on rat liver in vitro," *Toxicol In Vitro*, vol. 24, no. 8, pp. 2097-2103, 2010.
  32. O. Kucera, V. Mezera, A. Moravcova, R. Endlicher, H. Lotkova, Z. Drahota and Z. Cervinkova, "In Vitro Toxicity of Epigallocatechin Gallate in Rat Liver Mitochondria and

Hepatocytes," *Oxid Med Cell Longev*, vol. 2015, pp. 10, 2015.

33. H. Ohkawa, N. Ohishi and K. Yagi, "Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction," *Anal Biochem*, vol. 95, no. 2, pp. 351-358, 1979.

34. Z. Červinková, P. Křiváková, A. Lábajová, T. Roušar, H. Lotková, O. Kučera, R. Endlicher, M. Červinka and Z. Drahota, "Mechanisms participating in oxidative damage of isolated rat hepatocytes," *Arch Toxicol*, vol. 83, no. 4, pp. 363-372, 2009.

35. T. Rousar, O. Kucera, H. Lotkova and Z. Cervinkova, "Assessment of reduced glutathione: comparison of an optimized fluorometric assay with enzymatic recycling method," *Anal Biochem*, vol. 423, no. 2, pp. 236-240, 2012.

36. T. Rousar, E. Nydlova, P. Cesla, P. Stankova, O. Kucera, P. Parik and Z. Cervinkova, "Purified acetaminophen-glutathione conjugate is able to induce oxidative stress in rat liver mitochondria," *Physiol Res*, vol. 61 Suppl 2, pp. S103-109, 2012.

37. M. W. Pfaffl, G. W. Horgan and L. Dempfle, "Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR," *Nucleic Acids Res*, vol. 30, no. 9, pp. e36, 2002.

38. T. Sabaretnam, L. Kritharides, J. N. O'Reilly and D. G. Le Couteur, "The effect of aging on the response of isolated hepatocytes to hydrogen peroxide and tert-butyl hydroperoxide," *Toxicol In Vitro*, vol. 24, no. 1, pp. 123-128, 2010.

39. J. Hwang, Y.-H. Kim, J.-R. Noh, G.-T. Gang, K.-S. Kim, H. Chung, S. Tadi, Y.-H. Yim, M. Shong and C.-H. Lee, "The protective role of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 on acetaminophen-induced liver injury is associated with prevention of adenosine triphosphate depletion and improvement of mitochondrial dysfunction," *Arch Toxicol*, pp. 1-8, 2014.

40. O. Kucera, S. Al-Dury, H. Lotkova, T. Rousar, D. Rychtrmoe and Z. Cervinkova, "Steatotic rat hepatocytes in primary culture are more susceptible to the acute toxic effect of acetaminophen," *Physiol Res*, vol. 61 Suppl 2, pp. S93-101, 2012.

41. L. Jofre-Monseny, A. M. Minihane and G. Rimbach, "Impact of apoE genotype on oxidative stress, inflammation and disease risk," *Mol Nutr Food Res*, vol. 52, no. 1, pp. 131-145, 2008.

42. H. M. Ni, B. L. Woolbright, J. Williams, B. Copple, W. Cui, J. P. Luyendyk, H. Jaeschke and W. X. Ding, "Nrf2 promotes the development of fibrosis and tumorigenesis in mice with defective hepatic autophagy," *J Hepatol*, vol. 61, no. 3, pp. 617-625, 2014.

**Table 1. Quantitative RT-PCR primer design data**

Official gene symbol	qPCR assay code (GENERI BIOTECH s.r.o.)	Reference sequence	Exons spanned
Housekeeping genes			
B2m	mB2m_Q1	NM_009735	1 / 2
Polr2a	mPolr2a_Q1	NM_009089	22 / 23
Genes of interest			
Gsta2	mGsta2_Q2	NM_008182	5 / 6
Hmox1	mHmox1_Q1	NM_010442	4 / 5
Nqo1	mNqo1_Q1	NM_008706	5 / 6

**Table 2. Biochemical parameters of cultivated hepatocytes.** WST-1 test (% of respective controls), activity of executioner caspases 3 and 7 (relative light units), levels of malondialdehyde (MDA) in medium (μmol/l), GSH levels in cell lysate (μmol/l), APAP-SG levels in cell lysate (μmol/l), ROS formation (% of respective controls). APAP-SG levels were measured in the 4-hour interval; all other values represent the 24-hour interval.

	WT + APAP (mmol/l)				ApoE4 + APAP (mmol/l)				ApoE3 + APAP (mmol/l)			
	0	0.5	1	4	0	0.5	1	4	0	0.5	1	4
WST-1 (n=6)	100.0±8.9	108.8±11.3	n/a	30.6±12.8 †††	100.0±13.1	92.6±11.6	91.1±16.6	15.2±8.6 ‡‡‡	100.0±12.2	91.5±18.0	80.7±14.0	9.2±3.8 ###
Caspases (n=4)	64.9±13.7	61.7±13.8	n/a	6.2±4.2	93.9±6.7	88.2±8.7	74.5±3.9	4.6±3.3 ‡‡‡	97.2±12.3	84.3±13.9	64.7±10.4	3.3±2.0 ###
MDA (n=4)	1.22±0.10	1.19±0.10	1.58±0.15	1.62±0.08	1.26±0.15	1.35±0.32	1.63±0.13	1.63±0.15	1.25±0.09	1.50±0.34	1.70±0.17	1.75±0.12
GSH (n=4)	29.3±1.4	21.4±1.7	7.4±1.7	4.2±0.0	36.4±2.4	30.5±1.0	8.1±5.0 ‡	ND	41.3±4.8	26.3±1.8	3.9±0.1	ND
APAP-SG (n=4)	ND	ND	ND	4.3±0.4	ND	ND	ND	12.1±0.8 *	ND	ND	ND	10.3±0.6
	WT + APAP (mmol/l)				ApoE4 + APAP (mmol/l)				ApoE3 + APAP (mmol/l)			
	0	0.5	1	2.5	0	0.5	1	2.5	0	0.5	1	2.5
ROS (n=8)	100±36	117±33	109±32	205±57	100±9	113±10	172±35 *	1409±73 ‡‡	100±13	96±15	356±70 #	1892±140 ###

†,††,††† vs control WT; ‡,‡‡,‡‡‡ vs control ApoE4; #,##,### vs control ApoE3; \*,\*\*,\* vs corresponding WT; p<0.05, 0.01, 0.001 respectively.  
n/a = not measured, ND = not detectable.

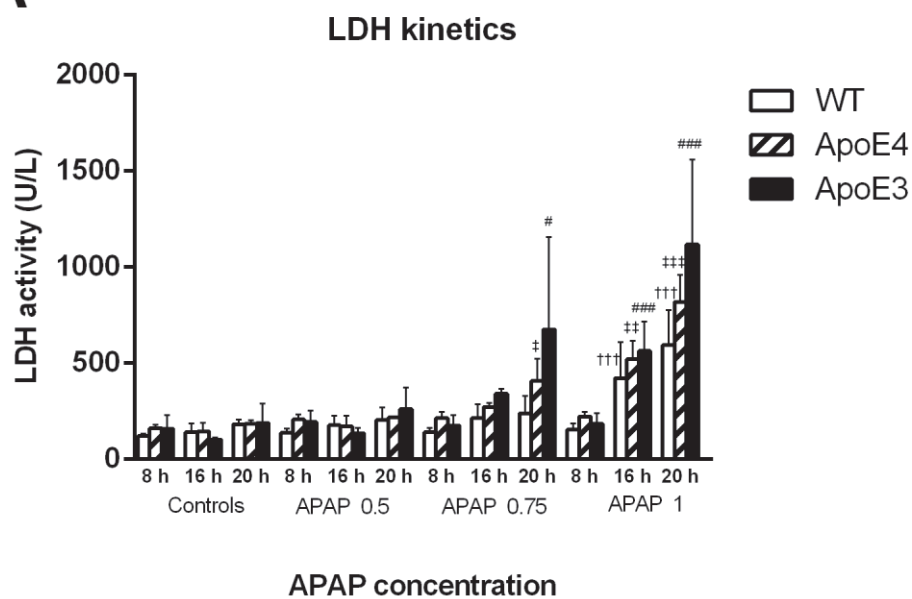
**Fig. 1. Lactate dehydrogenase activity:** **A)** Kinetics of extracellular lactate dehydrogenase (LDH), n=3-6. **B)** LDH leakage. <sup>†,††,†††</sup> vs control WT; <sup>†,††,†††</sup> vs control ApoE4; <sup>###,####</sup> vs control ApoE3; p<0.05, 0.01, 0.001 respectively.

**Fig. 2. Oil Red O staining:** Typical visual field of medium-treated hepatocytes from **A)** wild-type, **B)** ApoE4, **C)** ApoE3 mice. **D)** Percentage of positive cells; <sup>\*,\*\*\*</sup> p<0.05, 0.001, vs. corresponding WT. Oil Red O staining with haematoxylin as nuclear counter-staining, bright field, objective magnification 40x, bar 50 µm.

**Fig. 3. Mitochondrial membrane potential:** Hepatocytes from wild-type (A,D), ApoE4 (B,E) and ApoE3 mice (C,F) after 24 hour cultivation: **A, B, C** – hepatocytes treated with medium only; **D, E, F** – hepatocytes treated with 1 mmol/l APAP, note cells with high mitochondrial potential (orange) and low potential (green). Percentage of cells with high potential **G)** after 4h and **H)** after 24 h; <sup>†,††,†††</sup> vs control WT; <sup>†,††,†††</sup> vs control ApoE4; <sup>###,####</sup> vs control ApoE3; <sup>\*,\*\*\*</sup> vs corresponding WT; p<0.05, 0.01, 0.001 respectively. JC-1 staining, objective magnification 40x, bar 50 µm.

**Fig. 4. Gene and protein expression:** **A)** Western blot after 4 h cultivation. Densitometry analysis of **B)** Bcl-2, **C)** phosphorylated 4E-BP1. Quantitative real-time PCR comparing gene expression in ApoE3 vs ApoE4 hepatocytes after 24 h cultivation, box-and-whisker diagrams: **D)** medium-treated, **E)** treatment with 0.5 mmol/l APAP.

**A**



**B**

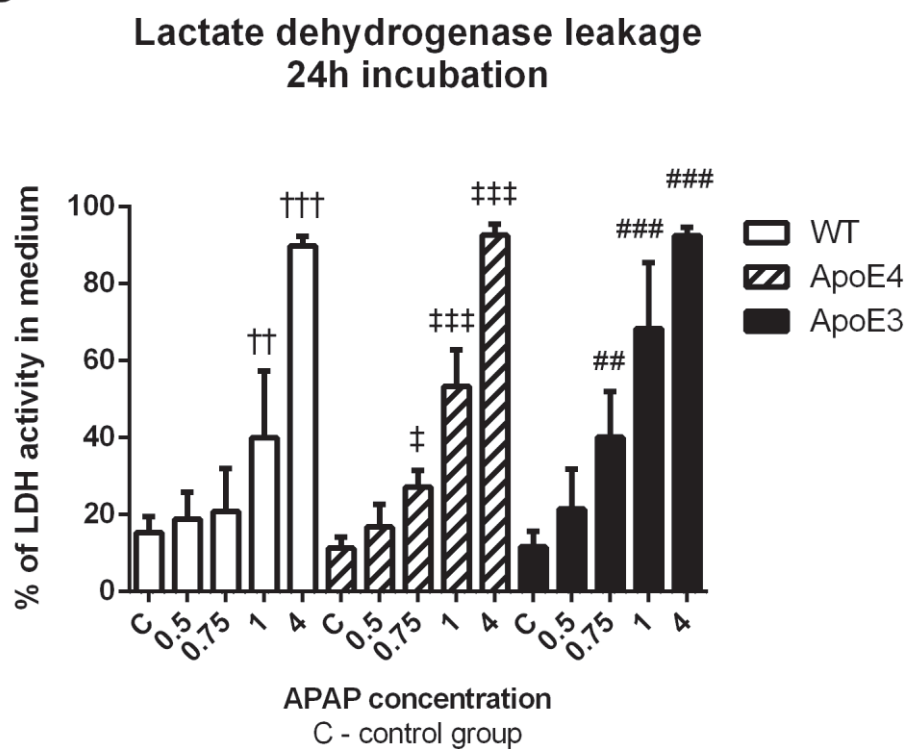


Fig. 1

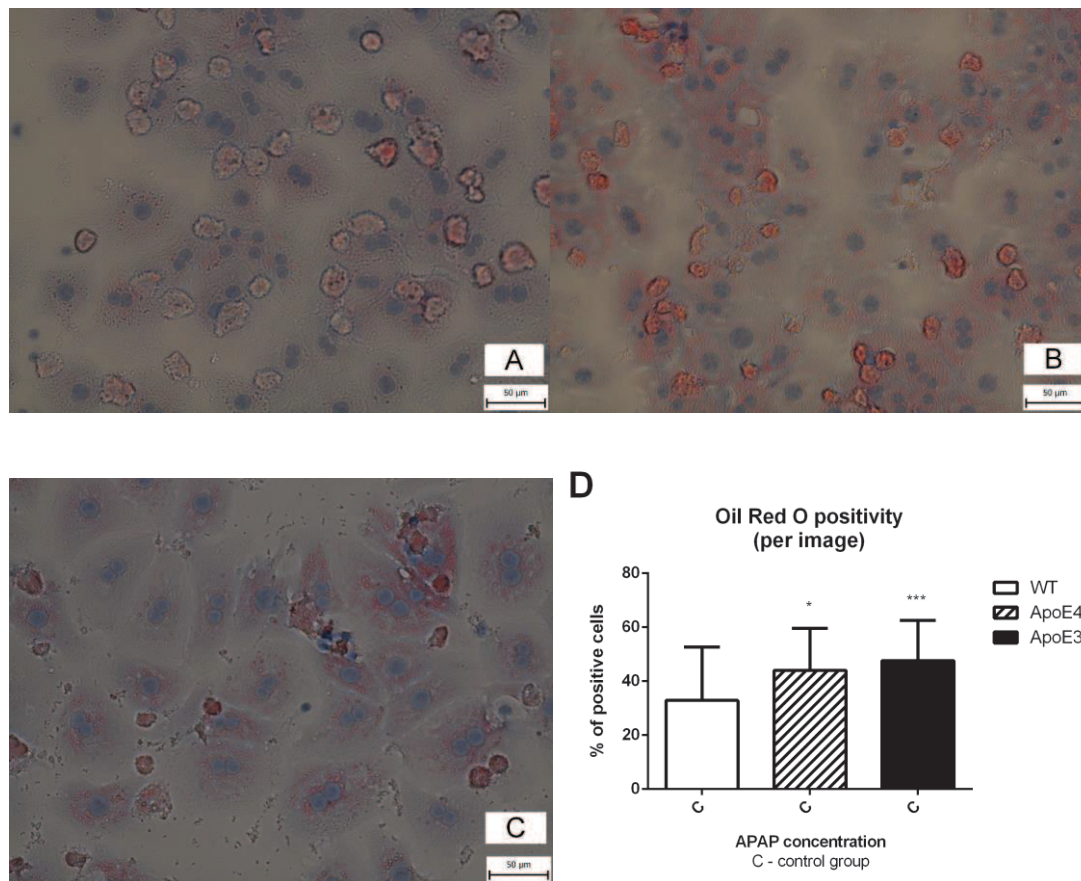
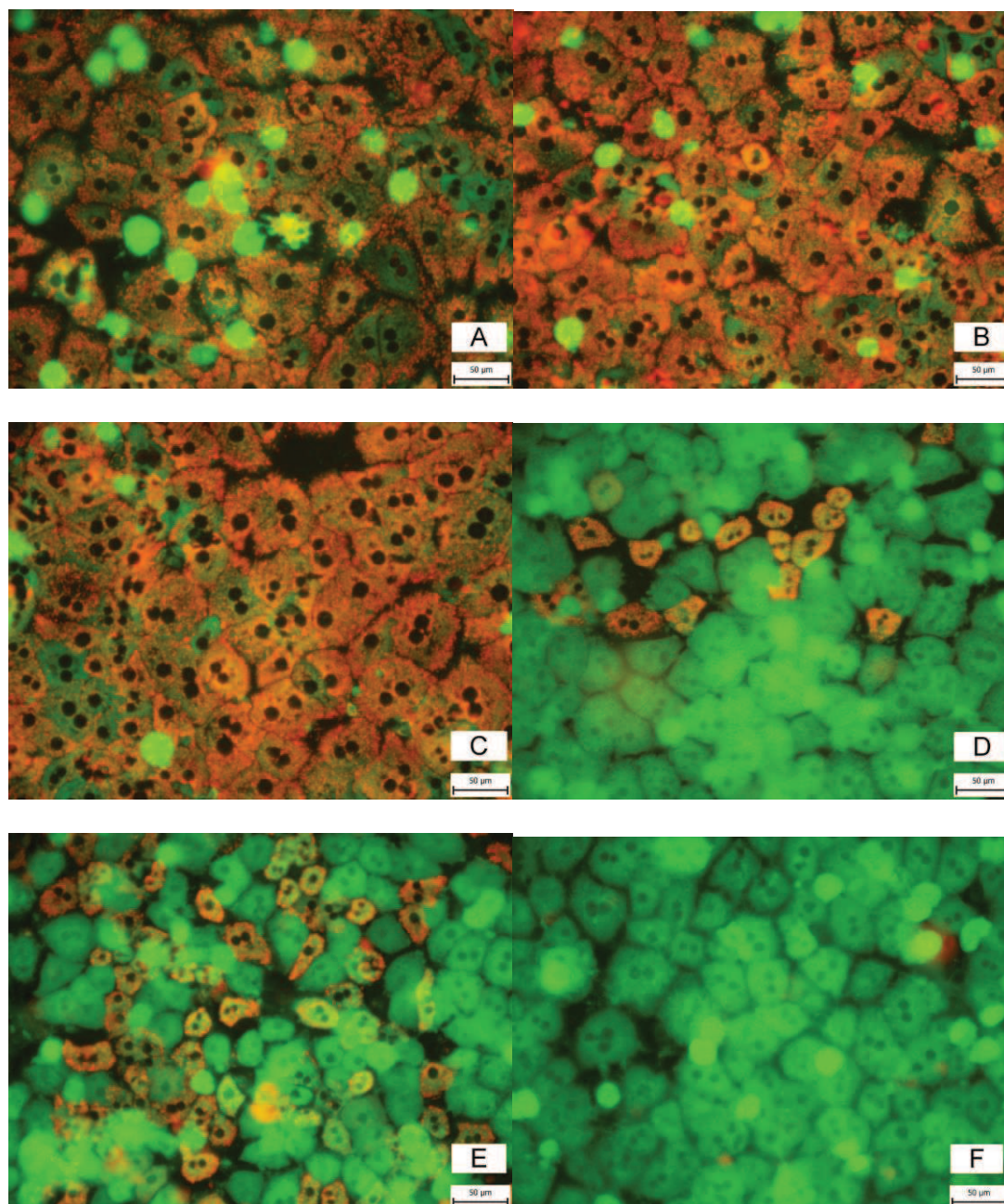
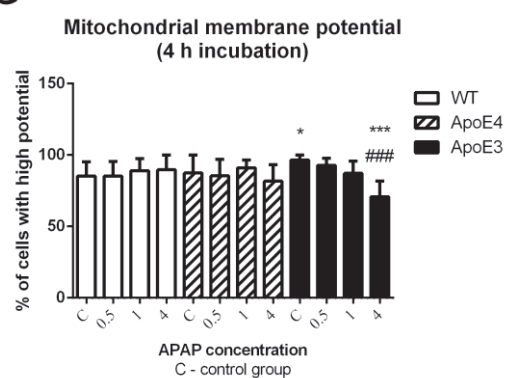


Fig. 2

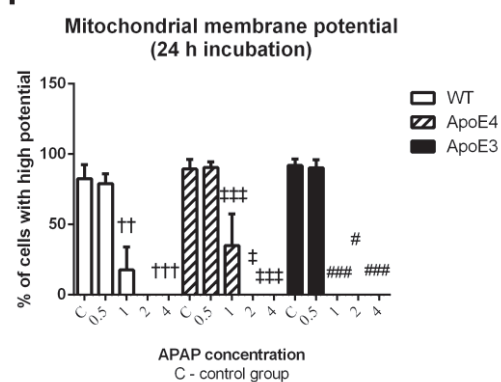




**G**



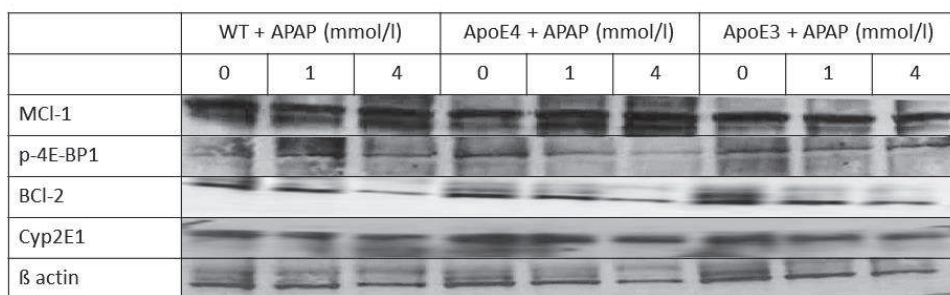
**H**



**Fig. 3**

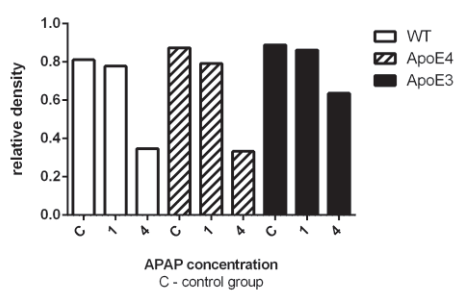


**A**



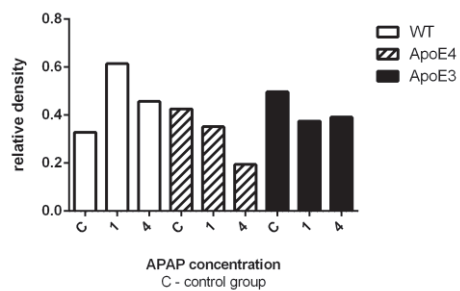
**B**

Bcl-2 expression after 4 h cultivation



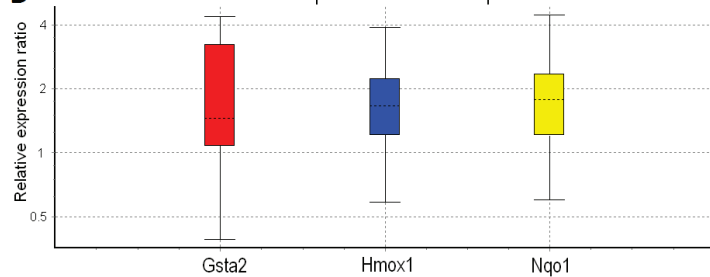
**C**

Phospho-4E-BP1 expression after 4 h cultivation



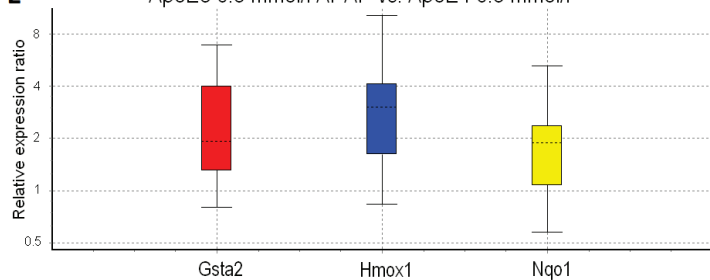
**D**

Control ApoE3 vs. Control ApoE4



**E**

ApoE3 0.5 mmol/l APAP vs. ApoE4 0.5 mmol/l



**Fig. 4**